

Die Biogenese des COP9 Signalosoms wird durch microRNAs der let-7-Familie reguliert

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie**

**eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Dipl.-Biol. Ulrike Leppert

**Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches**

**Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann**

Gutachter/innen:

- 1. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel**
- 2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau**
- 3. Prof. Dr. Wolfgang Poller**

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 09. 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1 Das COP9 Signalosom | 6 |
| 1.1.1 Der Aufbau des Signalosoms | 7 |
| 1.1.2 Die Interaktionspartner des Signalosoms | 10 |
| 1.1.3 Die Aktivitäten des CSN | 11 |
| 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System | 12 |
| 1.2.1 Die Cullin RING Ubiquitin Ligasen | 13 |
| 1.2.2 Die Regulation der Assemblierung der CRL-Komplexe | 13 |
| 1.2.3 Das 26S Proteasom | 15 |
| 1.3 Der Transkriptionsfaktor STAT1 | 16 |
| 1.3.1 Die Familie der STATs | 16 |
| 1.3.2 Die Struktur der STAT Proteine | 17 |
| 1.3.3 Die Struktur und Funktion von STAT1 | 18 |
| 1.3.4 Der JAK-STAT-Signalweg | 19 |
| 1.3.5 Die Regulation der STAT-Proteine | 20 |
| 1.4 MicroRNAs | 22 |
| 1.4.1 Die Bedeutung von MicroRNAs | 22 |
| 1.4.2 Die let-7-Familie | 23 |
| 1.4.3 c-Myc und dessen Wechselwirkungen mit let-7 | 25 |
| 2. Zielsetzung | 28 |
| 3. Materialien und Methoden | 29 |
| 3.1 Materialien | 29 |
| 3.1.1 Chemikalien | 29 |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien | 30 |
| 3.1.3 Kits | 31 |
| 3.1.4 Enzyme | 32 |
| 3.1.5 Größenstandards | 32 |
| 3.1.6 Primer | 32 |
| 3.1.7 Primärantikörper | 34 |
| 3.1.8 Sekundärantikörper | 34 |
| 3.1.9 3.1.9 Vektoren | 34 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.10 verwendete siRNA..... | 35 |
| 3.1.11 verwendete miRNA Hairpin Inhibitoren..... | 35 |
| 3.1.12 3verwendete miRNA-Mimics | 35 |
| 3.1.13 Puffer | 35 |
| 3.1.14 Medien..... | 36 |
| 3.1.15 Zellkulturmedien und Zusätze..... | 36 |
| 3.1.16 <i>Escherichia coli</i> Stämme | 37 |
| 3.1.17 Eukaryotische Zelllinien | 37 |
| 3.1.18 Geräte | 37 |
| 3.1.19 verwendete Software | 38 |
| 3.1.20 verwendete Software für die miRNA-Analyse..... | 38 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden..... | 39 |
| 3.2.1 Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen..... | 39 |
| 3.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen..... | 39 |
| 3.2.3 Herstellung von kompetenten Zellen | 39 |
| 3.2.4 Transformation durch Hitzeschock | 39 |
| 3.2.5 Plasmid- Minipräparation | 40 |
| 3.2.6 Plasmid- Maxipräparation..... | 40 |
| 3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR) | 40 |
| 3.2.8 Agarosegelelektrophorese..... | 41 |
| 3.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 41 |
| 3.2.10 Restriktionsverdau von DNA..... | 41 |
| 3.2.11 DNA-Fällung mit Ethanol | 42 |
| 3.2.12 RNA-Präparation | 42 |
| 3.2.13 DNaseI Verdau | 42 |
| 3.2.14 Microarrays..... | 42 |
| 3.2.15 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren..... | 42 |
| 3.2.16 cDNA Synthese | 43 |
| 3.2.17 Real-Time PCR | 43 |
| 3.3 Proteinbiochemische Methoden..... | 44 |
| 3.3.1 Bestimmung der Proteinmenge | 44 |
| 3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 44 |
| 3.3.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native-PAGE) | 45 |
| 3.3.4 Western Blot und Immundetektion..... | 46 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.5 Ponceau-S-Färbung | 46 |
| 3.3.6 Glycerolgradientenzentrifugation | 46 |
| 3.3.7 TCA-Fällung | 46 |
| 3.4 Zellbiologische Methoden | 47 |
| 3.4.1 Kultivierung der Zellen | 47 |
| 3.4.2 Bestimmung der Zellzahl | 47 |
| 3.4.3 Stimulation der Zellen mit Zytokinen | 48 |
| 3.4.4 Behandeln der Zellen mit Inhibitoren | 48 |
| 3.4.5 Transiente Transfektion | 48 |
| 3.4.5.1 Transiente Transfektion von Vektoren | 48 |
| 3.4.5.2 Transiente Transfektion von siRNA | 48 |
| 3.4.5.3 Transiente Co-Transfektion von Vektoren und miRNA-Inhibitoren | 48 |
| 3.4.5.4 Transiente Co-Transfektion von Vektoren und miRNA-Mimics | 49 |
| 3.4.6 Zelllyse | 49 |
| 3.5 Die statistische Auswertung | 49 |
| 4. Ergebnisse | 50 |
| 4.1 Die Analyse der siCSN1-Zellen | 50 |
| 4.1.1 Die Analyse der CSN-Untereinheiten und von c-Myc und STAT1 in siCSN1-Zellen auf Proteinebene | 50 |
| 4.1.2 Die Analyse der CSN-Untereinheiten in siCSN1-Zellen auf mRNA-Ebene | 50 |
| 4.2 Die Überexpression der Untereinheit CSN1 in siCSN1-Zellen | 52 |
| 4.2.1 Die Analyse der Überexpression auf Proteinebene | 52 |
| 4.2.2 Die Analyse der Expression der CSN-Untereinheiten nach CSN1-Überexpression in siCSN1-Zellen auf mRNA-Ebene | 54 |
| 4.2.3 Der Einfluss der Regulation des CSN-Komplexes auf die mRNA-Expression des proteasomalen Lids | 58 |
| 4.3 Die Analyse der CSN-Expression nach CSN2-Überexpression | 59 |
| 4.3.1 Die Charakterisierung der mRNA-Expression in HeLa-Zellen nach transienter CSN2-Überexpression | 59 |
| 4.3.2 Die Charakterisierung der mRNA-Expression in murinen B8- Fibroblasten nach stabiler CSN2-Überexpression | 61 |
| 4.4 Der Einfluss von Zytokinstimulation auf die CSN-Expression | 62 |
| 4.4.1 Der Effekt von IFN α auf die CSN-Expression | 62 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.2 Der Effekt von IFN γ auf die CSN-Expression | 64 |
| 4.5 Die Inhibition von JAK2 und TYK2 durch die Inhibitoren AG9 und AG490 | 64 |
| 4.6 Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von STAT1 auf die CSN-Expression | 65 |
| 4.7 Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von c-Myc auf die CSN-Expression | 67 |
| 4.8 Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von Lin28B auf die CSN-Expression | 68 |
| 4.9 miRNAs der let-7-Familie regulieren die CSN-Proteinexpression | 69 |
| 4.9.1 Der Effekt von let-7 Antisense-Inhibitoren auf die CSN-Proteinexpression | 69 |
| 4.9.2 Der Effekt von let-7-Mimics auf die CSN-Proteinexpression | 74 |
| 4.9.3 miRNAs der let-7-Familie regulieren die Expression des proteasomalen Lids..... | 75 |
| 4.10 Die Analyse der CSN-Assemblierung | 78 |
| 4.10.1 Die Analyse der CSN-Assemblierung nach Überexpression von CSN1 in siCSN1-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation | 78 |
| 4.10.2 Der Effekt der Zytokinstimulation auf die CSN-Assemblierung. | 80 |
| 5. Diskussion | 82 |
| 5.1 In den siCSN1-Zellen zeigt das CSN nur marginale Veränderungen auf mRNA-Ebene | 82 |
| 5.2 Die Regulation der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten, von STAT1 und c-Myc in siCSN1-Zellen | 84 |
| 5.3 Der Einfluss der Regulation des CSN-Komplexes auf den proteasomalen Lid | 85 |
| 5.4 Der Einfluss der CSN2-Überexpression auf die RNA-Expression..... | 86 |
| 5.5 Die Regulation der CSN-Expression in zytokinstimulierten HeLa-Zellen . | 87 |
| 5.6 Der Effekt der Inhibition der JAK-Kinasen mittels pharmakologischer Inhibitoren..... | 88 |
| 5.7 Die Auswirkungen der siRNA-vermittelten Inhibition von STAT1, c-Myc bzw. Lin28B auf die Proteinexpression der CSN-Untereinheiten..... | 89 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.8 Der Effekt von komplementären let-7-Inhibitoren auf die CSN-Proteinexpression..... | 91 |
| 5.9 Der Effekt von let-7-Mimics auf die CSN-Proteinexpression | 92 |
| 5.10 Die Regulation der Biogenese des CSN wird durch miRNAs reguliert... | 93 |
| 5.11 miRNAs der let-7-Familie binden an die mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten | 94 |
| 5.12 Die Analyse der Assemblierung des CSN mittels Dichtegradientenzentrifugation | 95 |
| 6. Zusammenfassung | 97 |
| 7. Summary | 99 |
| 8. Ausblick..... | 100 |
| 9. Abkürzungsverzeichnis | 101 |
| 10. Literaturverzeichnis..... | 104 |
| 11. Publikationsliste | 119 |
| 12. Selbstständigkeitserklärung..... | 120 |

1. Einleitung

1.1 Das COP9 Signalosom

Das COP9 (*constitutive photomorphogenic*) Signalosom ist ein hochkonservierter Proteinkomplex, bestehend aus acht Untereinheiten, die absteigend nach ihrem Molekulargewicht CSN1 bis CSN8 benannt wurden (Deng *et al.*, 2000). Das CSN hat viele Funktionen und ist unter anderem an der Zellproliferation, Signaltransduktion sowie der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Kato *et al.*, 2009). Der CSN-Komplex wurde erstmals in *Arabidopsis thaliana* als Negativregulator der Photomorphogenese entdeckt (Chamovitz *et al.*, 1996). Bei der Analyse von Mutanten wurden drei Gruppen mit verändertem Licht-Dunkel-Verhalten gefunden. Diese wurden *cop/det/fus* Mutanten genannt. Sie wiesen ein verändertes Wachstum bei Dunkelheit (*constitutive photomorphogenic*) auf, zeigten eine Akkumulation des Pigments Anthocyanin in den reifen Samen und Keimblättern (*fusca*) und besaßen ein verkürztes Hypokotyl (*de-etiolated*) (Wei & Deng, 1992; Kwok *et al.*, 1996). Die dabei identifizierten Proteine COP8, COP9 und COP11 gehören zu einem essentiellen Komplex der Photomorphogenese, der COP9 genannt wurde.

Der COP9-Komplex ist hochkonserviert. In *A. thaliana* besitzt das Gen *AtCSN7* zwei alternativ gespleißte Genprodukte *AtCSN7i* und *AtCSN7ii* (Fu *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2009). Des Weiteren werden *AtCSN5* und *AtCSN6* von zwei Genen kodiert. Dadurch kommt es zur Bildung von zwei Isoformen (Kwok *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2001). In *Schizosaccharomyces pombe* besteht der COP9-Komplex aus sechs Untereinheiten, in dem CSN6 und CSN8 fehlen (Mundt *et al.*, 1998).

Tabelle 1: Nomenklatur der CSN Untereinheiten (nach Wei & Deng, 2003).

| | Mammalia | <i>Arabidopsis</i> | <i>Drosophila</i> | <i>S. pombe</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
|------|--------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| CSN1 | GPS1, mfh, Sgn1 | FUS6, COP11 | Dch1 | Caa1 | CSN9 |
| CSN2 | Trip15, hAlien, Sgn2, COPS2 | FUS12 | Alien, Dch2 | | CSN10/RR12 |
| CSN3 | Sgn3, COPS3 | FUS11 | Dch3 | | CSN11/PCI8 |
| CSN4 | Sgn4, COPS4 | COP8, FUS4 | Dch4 | | CSN12 |
| CSN5 | Jab1, COPS5 | AJH1, AJH2 | Dch5 | | RR11 |
| CSN6 | HVIP, Sgn6, COPS6 | AtCSN6A, AtCSN6B | Dch6 | | CS11 |
| CSN7 | COPS7a, Sgn7, COPS7b | CSN7i, FUS5, CSN7ii | Dch7 | | RPN5/NAS5 |
| CSN8 | hCOP9, Sgn8 | COP9, FUS7 | | | |

1.1.1 Der Aufbau des Signalosoms

Das COP9 Signalosom wurde in *A. thaliana* erstmals entdeckt und später bei der Aufreinigung des 26S Proteasoms aus roten Blutzellen co-isoliert (Seeger *et al.*, 1998). Der CSN-Komplex ist evolutionär hochkonserviert. Er kommt in allen Eukaryoten vor und besteht aus acht Untereinheiten CSN1-CSN8. Sechs Untereinheiten besitzen C-terminal eine PCI/PINT (Proteasom, COP9, eukaryotischer Initiationsfaktor3/Proteasomuntereinheiten, Int-6, Nip-1, Trip-15) Domäne. Zwei Untereinheiten, CSN5 und CSN6 besitzen hingegen N-terminal eine MPN (Mpr1-Pad1-N-terminal) Domäne. Jeder CSN Untereinheit kann eine paraloge Lid-Untereinheit des 19S Proteasom Regulators zugeordnet werden (Henke *et al.*, 1999; Maytal-Kivity *et al.*, 2002; Wei & Deng, 2003; Schwechheimer, 2004; Scheel & Hofmann, 2005).

Tabelle 2: CSN Untereinheiten, die entsprechenden Domänen sowie ihre proteasomalen Lid und eIF3 Paraloge (Scheel & Hofmann, 2005).

| CSN | Lid | eIF3 | Domäne |
|---------|--------------|----------------------------|--------|
| CSN1 | Rpn1/PSMD6 | eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3l | PCI |
| CSN2 | Rpn6/PSMD11 | eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3l | PCI |
| CSN3 | Rpn3/PSMD3 | eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3l | PCI |
| CSN4 | Rpn5/PSMD12 | eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3l | PCI |
| CSN5 | Rpn11/PSMD14 | - | MPN |
| CSN6 | Rpn8/PSMD7 | eIF3f, eIF3h | MPN |
| CSN7a,b | Rpn9/PSMD13 | eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3l | PCI |
| CSN8 | Rpn11/PSMD8 | eIF3k | PCI |

Die PCI Domänen sind α -helikal aufgebaut. Sie dienen der Integration in den Komplex (z. B. CSN1) bzw. der Interaktion der Untereinheiten miteinander und besitzen eine Rückgratfunktion (Tsuge *et al.*, 2001; Wei & Deng, 2003). Die MPN Domäne der COP9-Untereinheit CSN5 bzw. der Lid-Untereinheit Rpn11 beinhaltet eine intrinsische Metalloproteaseaktivität. Diese wird vom JAMM (JAB1/MPN/MOV34 Metalloenzym) bzw. MPN+ Motiv vermittelt, welches ein konserviertes Bindemotiv aufweist. Das JAMM-Motiv besitzt eine katalytische Aktivität. Es spaltet Nedd8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) von Cullinen und ist daher im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) von wesentlicher Bedeutung. Die Bindung eines Zink-Atoms als Co-Faktor ist essentiell für die katalytische Aktivität (Cope *et al.*, 2002; Wei & Deng, 2003; Ambroggio *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008).

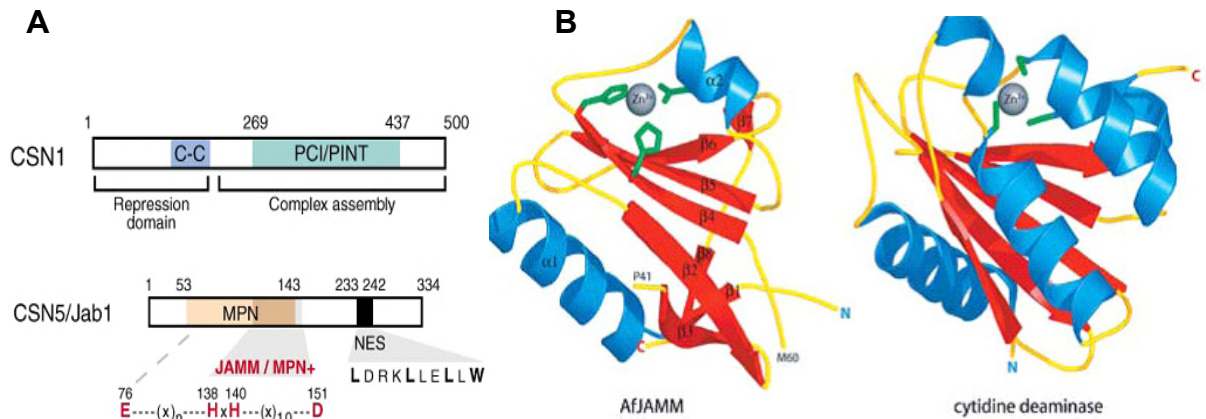


Abbildung 1: A) Die Struktur der PCI-Domäne (CSN1) und der JAMM-Domäne (CSN5). Die konservierte Sequenz des JAMM-Motivs ist rot markiert, das nukleäre Exportsignal (NES) schwarz hervorgehoben (Wei & Deng, 2003). B) Die Kristallstruktur des JAMM-Motivs aus *Archaeoglobus fulgidus* (AfJAMM) bzw. einer Cytidineaminase. Die Zinkliganden sind grün dargestellt, das Zink-Atom grau (Ambroggio *et al.*, 2004).

Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten die Struktur des CSN sowie seine Homologie zum Lid nachgewiesen werden. Dabei wurde ersichtlich, dass die Struktur des CSN eine hohe Variabilität aufweist. Die Untereinheiten besitzen jedoch immer eine asymmetrische Anordnung. Es konnten sowohl beim CSN als auch beim Lid eine zentrale Furche nachgewiesen werden (Kapelari *et al.*, 2000).

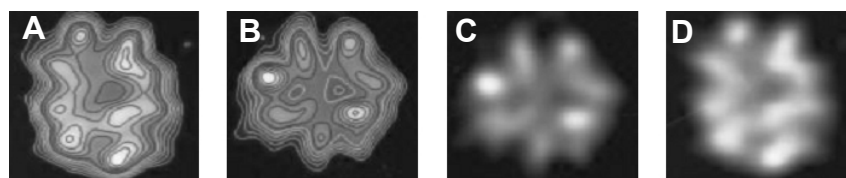


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des CSN und des Lid. A) Dargestellt ist die Verteilung der Untereinheiten des CSN, B) die Konturlinien des CSN. C) zeigt die Untereinheiten des proteasomalen Lid. D) die Konturlinien des Lid (Kapelari *et al.*, 2000).

Huang *et al.* zeigten 2005, dass das CSN und der proteasomale Lid miteinander interagieren. Des Weiteren kommt es zur Bildung von sogenannten Superkomplexen aus CSN, Proteasom und CRLs, bei denen das CSN als Assemblierungsplattform dient (Huang *et al.*, 2009). Ferner kann das Signalosom als alternativer proteasomaler Lid fungieren (Deshaies & Meyerowitz, 2000; Li & Deng, 2003).

Biochemische Analysen ergaben, dass Untereinheiten des Signalosoms sowohl in monomeren Formen als auch in Minikomplexen vorliegen. Es konnte des Weiteren

an rekombinanten Untereinheiten gezeigt werden, dass der CSN-Komplex aus zwei Modulen CSN1/2/3/8 und CSN4/5/6/7 besteht, die miteinander verbunden sind (Abb. 3 A)(Sharon *et al.*, 2009; Enchev *et al.*, 2010). Die Untereinheit CSN5 tritt ferner sowohl in monomerer Form als auch integriert im Komplex vor, kann seine katalytische Aktivität aber nur im Komplex ausüben (Wei & Deng, 2003; Wei *et al.*, 2008).

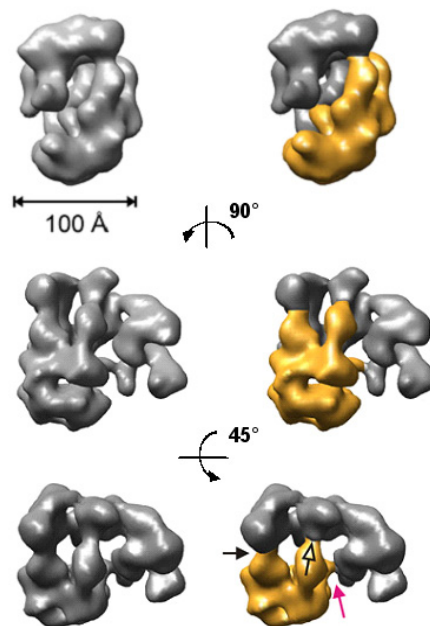


Abbildung 3: Das Model der CSN Struktur. Die dreidimensionale Darstellung des CSN. Der Komplex besteht aus acht Untereinheiten. Dabei bilden jeweils vier Untereinheiten ein Modul. Die Untereinheiten CSN1, CSN2, CSN3 und CSN8 (graues Modul) bilden das große Fragment, CSN4, CSN5, CSN6 und CSN7 (gelbes Modul) bilden das kleine Segment. Die Pfeile (schwarz, rosa und weiß) weisen auf die Verbindungsstellen zwischen den Modulen (Enchev *et al.*, 2010).

1.1.2 Die Interaktionspartner des Signalosoms

Das Signalosom interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen. Uhle *et al.* zeigten 2003, dass die Proteinkinasen CK2 und D mit Untereinheiten des CSN assoziiert sind. Dabei bindet CK2 an CSN3 bzw. CSN7 sowie PKD an CSN3. Des Weiteren bindet die Inositol-1,3,4-Triphosphat 5/6-Kinase (IP₃-5/6-Kinase) an CSN1 (Sun *et al.*, 2002). Die assoziierten Kinasen können durch Curcumin, Piceatannol oder andere Inhibitoren gehemmt werden (Füllbeck *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun (*jun oncogene*), Bestandteil von AP-1 (*activator protein 1*), durch die mit dem CSN assoziierten Kinasen stabilisiert diesen. Dieses führt zu einer erhöhten AP-1-Aktivität (Naumann *et al.*, 1999). Der Tumorsuppressor p53 wird

durch die assoziierten Kinasen phosphoryliert und somit für den proteasomalen Abbau markiert. Durch die Hemmung dieser Kinasen mittels Curcumin oder dessen Derivaten kommt es hingegen zu einer Stabilisierung von p53 und einem Abbau von c-Jun (Uhle *et al.*, 2003; Harari-Steinberg, 2004; Füllbeck *et al.*, 2005). Die Untereinheit CSN5 interagiert innerhalb des CSN mit den meisten Proteinen, darunter c-Jun, p53 oder HIF1 α (*hypoxia-inducible factor*). Ferner interagieren die Untereinheiten mit Bestandteilen des UPS (CSN2- CUL1, CUL2, CSN6- Rbx1) sowie dem Proteasom (CSN1-Rpn6) und dem eIF3 (CSN1-eIF3c, CSN3, CSN6 & CSN7-eIF3e/Int-6, CSN8- eIF3c).

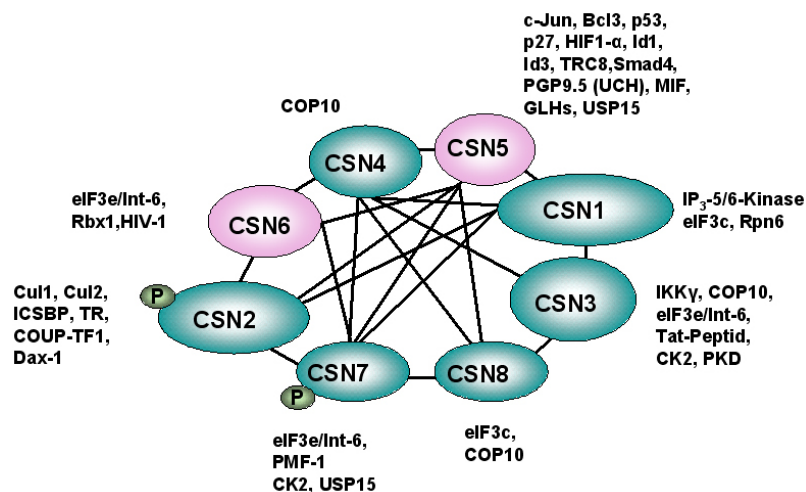


Abbildung 4: Das CSN mit seinen Interaktionspartnern. Die Interaktion der CSN Untereinheiten untereinander ist durch schwarze Linien gekennzeichnet. Die PCI-Domänen sind türkis-farbend, die MPN Domänen violett dargestellt. Interagierende Proteine stehen jeweils neben der entsprechenden CSN Untereinheit.

1.1.3 Die Aktivitäten des CSN

Das CSN übt drei bislang entdeckte Funktionen aus. Das JAMM-Motiv der CSN-Untereinheit CSN5 verleiht ihr eine Metalloproteaseaktivität, die das ubiquitin-ähnliche Protein Nedd8 von Cullinen spaltet. Das CSN ist außerdem mit Kinasen assoziiert und besitzt dadurch eine Kinaseaktivität. Diese Kinasen binden an die Untereinheiten CSN3 (PKD) bzw. CSN7 (CK2 und PKD) sowie an CSN1 (IP₃-5/6-Kinase) und phosphorylieren sowohl die Untereinheiten CSN2 und CSN7 als auch proteasomale Substrate (Sun *et al.*, 2002; Uhle *et al.*, 2003). Ferner ist das CSN mit der ubiquitin-spezifischen Protease USP15 assoziiert und besitzt dadurch eine deubiquitinierende Aktivität. USP15 bindet an CSN5 und CSN7 und schützt Substrate wie Rbx1 vor Autoubiquitinierung und proteasomalem Abbau (Hetfeld *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2009).

1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Ubiquitinierung von Substraten stellt einen essentiellen Mechanismus dar, um fehlerhafte oder nicht benötigte Proteine für den proteasomalen Abbau zu markieren. Hierfür wird Ubiquitin (Ub) auf bestimmte Substrate übertragen und diese somit für den Abbau markiert. Die Kaskade der Ubiquitinierung umfasst drei Schritte. Zuerst wird das Ubiquitin durch das ubiquitinaktivierende Enzym E1 unter ATP-Verbrauch auf einen Cysteinrest über eine Thioesterbindung an den C-Terminus des E1 gebunden. Anschließend wird das Ubiquitin auf einen Cysteinrest des ubiquitin-konjugierenden Enzyms E2 übertragen und über eine Thioesterbindung an das E2 gebunden. Im folgenden Schritt wird das Ubiquitin durch eine Ubiquitinligase (E3) auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des entsprechenden Substrats übertragen. Dieser Vorgang wird Ubiquitinierung genannt und markiert die Substrate für den proteasomalen Abbau (Hotton & Callis, 2008). Es gibt zwei Hauptklassen von E3s in Eukaryoten. Die erste Klasse besitzt eine HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) Domäne und kann E2 binden. Das Ubiquitin wird zuerst auf das E3 und anschließend auf das Substrat übertragen. Die zweite Klasse besitzt eine RING (*really interesting new gene*)-Domäne. Hier fungiert die E3 Ligase als Mediator. Sie bringt das E2 und das Substrat in eine räumliche Nähe. Das Ubiquitin wird hierbei direkt vom E2 auf das Substrat übertragen (Pickart, 2001; Rotin & Kumar, 2009).

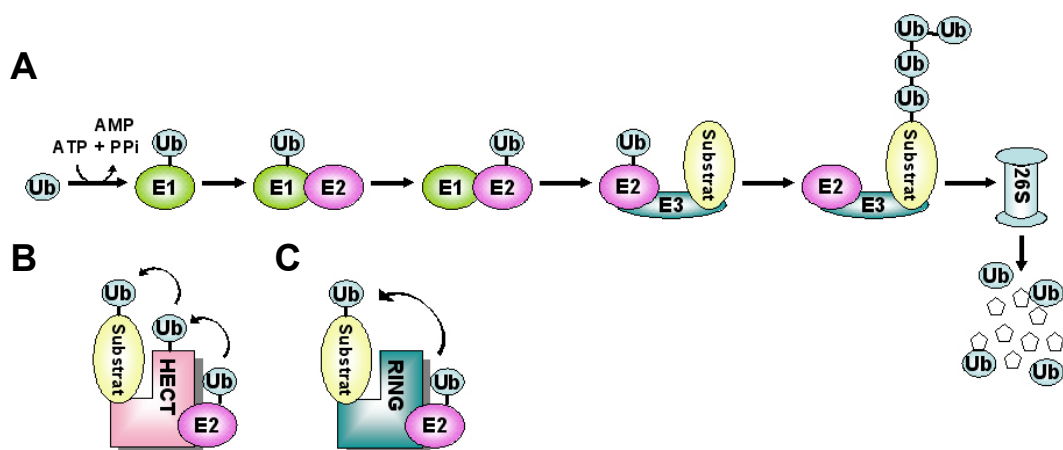


Abbildung 5: A) Die Kaskade der Ubiquitinierung von Substraten. Jeweils ein Ubiquitinmolekül wird über eine Enzymkaskade (E1-E3) auf das spezifische Substrat übertragen. Ist die Ubiquitinkette mindestens vier Ubiquitinmoleküle lang, markiert dieses das Substrat für den proteasomalen Abbau und wird vom 26S Proteasom degradiert. B) E3 mit HECT Domäne. Das Ubiquitin wird von dem E2 auf das E3 übertragen und von dort auf das Substrat. C) E3 mit RING Domäne. Das E3 vermittelt die räumliche Nähe zwischen dem E2 und dem Substrat. Das Ubiquitin wird von E2 direkt auf das Substrat übertragen (nach Rotin & Kumar, 2009, modifiziert)

1.2.1 Die Cullin RING Ubiquitin Ligasen

Die Cullin RING Ubiquitin Ligasen (CRL) bestehen aus einem Mitglied der Cullin-Familie, das als Gerüst agiert, sowie dem RING-Domäne Protein Rbx1, welches an das E2 bindet und einem Substratadaptoren.

Die Cullin-Familie setzt sich aus sieben Mitgliedern (Cul1, Cul2, Cul3, Cul4a, Cul4b, Cul5 und Cul7) zusammen. Sie besitzen N-terminal eine hochkonservierte Region, in der ein Adaptorprotein, wie z. B. Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*) binden kann. Dabei bindet Skp1 den F-Box Substratrezeptor. An der C-terminalen Domäne von Cullin bindet ein Ring-Finger Protein, wie z. B. das Ring Box Protein Rbx1 (*ring-box 1*), welches das E2 binden kann. Skp1, Cul1, Rbx1 und ein F-Box Protein bilden zusammen den CRL-Komplex (Wei & Deng, 2003; Petroski & Deshaies, 2005).

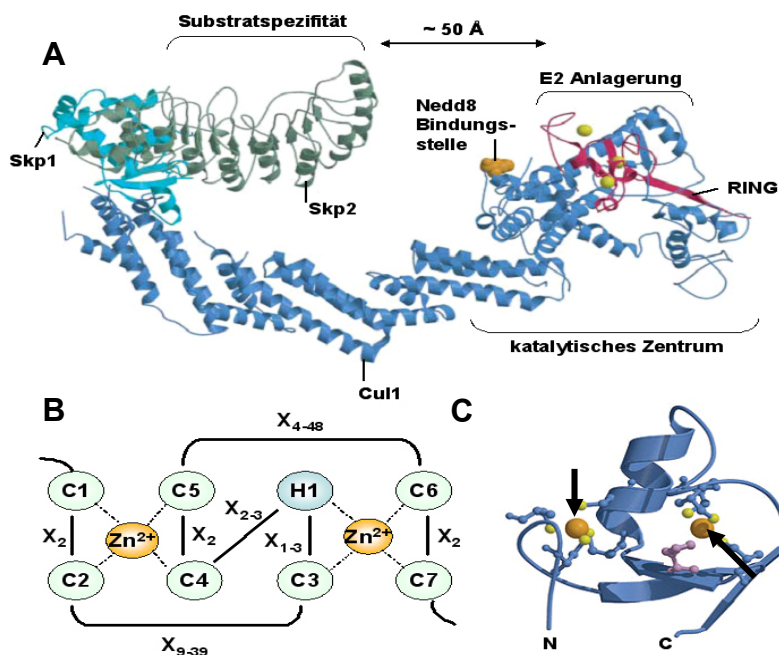


Abbildung 6: A) Die Struktur von CRL^{Skp2}. (Petroski & Deshaies, 2005, modifiziert).

B) RING Domänen besitzen ein spezifisches CX₂CX₉₋₃₉CX₁₋₃HX₂₋₃(C/H)X₂CX₄₋₄₈CX₂C-Motiv (C- Cystein, H- Histidin, X_n- AS Reste zwischen den Zink-Atomen) (nach Deshaies & Joazeiro 2009; nach Rotin & Kumar, 2009).

C) Kristallstruktur der RING Domäne. Die Pfeile weisen auf die Zink-Atome (Deshaies & Joazeiro, 2009, modifiziert).

1.2.2 Die Regulation der Assemblierung der CRL-Komplexe

Culline können durch das ubiquitin-ähnliche Protein Nedd8 modifiziert werden. Die Neddylisierung der Culline ist essenziell für die Assemblierung des CRL-Komplexes. Zunächst wird Nedd8 über eine Thioesterbindung an ein E1 (APP-BP1 -*NEDD8*

activating enzyme E1 subunit 1/Uba3-ubiquitin-like modifier activating enzyme 3) geknüpft. Danach wird es an einen konservierten Cysteinrest des E2 (Ubc12 - ubiquitin-conjugating enzyme E2M) gebunden, welches das Nedd8 auf eine ϵ -Aminogruppe des Cullins überträgt (Pan *et al.*, 2004).

Durch die Bindung vom CSN an das Cullin kommt es zur Deneddylierung und der Abspaltung des Nedd8 vom Cullin. Dieses führt zur Dissoziation des E2. Durch die Anlagerung von CAND1 (*cullin-associated neddylation dissociated*) kommt es zur Dissoziation von Skp1, dem F-Box-Protein, dem Ring-Finger-Protein und des CSN. Der Komplex wird dadurch inaktiviert. Die Neddylierung des Cullin führt zur Dissoziation von CAND1. Anschließend lagern sich Skp1, das F-Box-Protein und das Ring-Finger-Protein daran an. Danach folgt die Bindung des spezifischen Substrats an das F-Box-Protein. Die rekrutierten Substrate sind meist phosphoryliert. An den aktiven CRL-Komplex bindet das mit Ubiquitin beladene E2. Dieses überträgt nun das Ubiquitin auf das Substrat. Nach einer Kaskade, bei der Ubiquitin auf Lysinreste des vorherigen Ubiquitins geknüpft werden, löst sich das Substrat und wird proteasomal abgebaut (Wei & Deng, 2003; Richardson & Zundel, 2005; Saha & Deshaies, 2008).

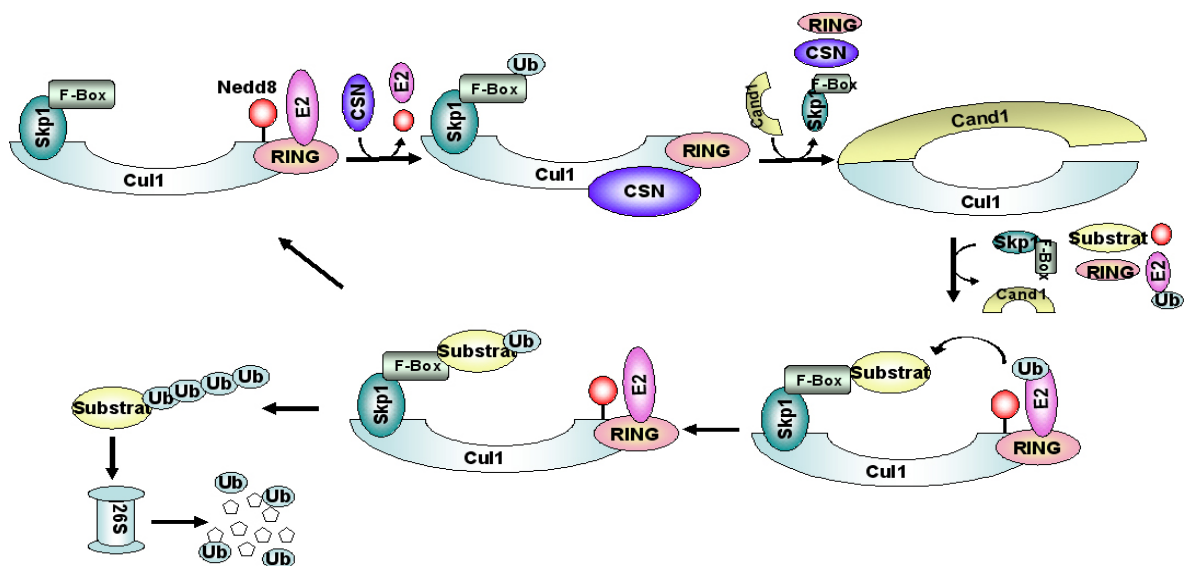


Abbildung 7: Die Assemblierung des CRL-Komplexes. Durch die Deneddylierung des Cullins mittels der Deneddyraseaktivität der CSN-Untereinheit CSN5 wird der CRL-Komplex zuerst inaktiviert. Durch erneute Neddylierung kann sich dieser dann neu assemblieren. Dabei wird der Komplex je nach Substrat spezifisch zusammengesetzt. Das Substrat wird ubiquitiniert und letztendlich proteasomal abgebaut.

1.2.3 Das 26S Proteasom

Das 26S Proteasom ist ein 2,5 MD großer, multimerer Proteinkomplex. Er besteht aus dem tonnenförmigen 20S-Kernpartikel (CP- *core particle*), welcher an einem oder an beiden Enden von einem 19S regulatorischen Partikel (RP) gebunden wird. Die zu degradierenden Proteine binden an den 19S RP (Cheng, 2009; Hendil *et al.*, 2009; Nickel *et al.*, 2009). Nach der Erkennung und der Bindung des zu degradierenden Substrates an den 19S-Komplex werden diese entwunden und unter ATP-Verbrauch in den 20S-Komplex transportiert. Dort befinden sich die katalytisch aktiven β -Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 , die eine Endopeptidaseaktivität aufweisen (Groll & Huber, 2003; Hendil *et al.*, 2009). Der 20S-Kernpartikel besitzt je nach Substrat drei verschiedene Aktivitäten, eine Chymotrypsin-ähnliche, eine Trypsin-ähnliche und eine Caspase-ähnliche Aktivität (Bochtler *et al.*, 1999; Groll & Huber, 2003; Navon & Ciechanover, 2009). Der 20S-Komplex besteht aus vier heptameren Ringen. Dabei bilden die zwei äußeren α -Ringe und die inneren β -Ringe drei Kammern innerhalb des 20S-Komplexes. Diese Kammern sind durch die N-terminalen Enden der α -Untereinheiten verschlossen. Die Assemblierung des 20S mit dem 19S RP zum 26S Proteasom kann zur Aktivierung des 20S CP führen (Groll *et al.*, 1997). Der 19S-Komplex besteht aus zwei Komponenten, dem Lid und der Base. Letztere besteht aus sechs AAA-ATPase (*ATPase associated with various activities*) Untereinheiten (Rpt1-6, *regulatory particle, ATPase-like*) sowie vier non-ATPase Untereinheiten Rpn1, Rpn2, Rpn10 und Rpn 13 (*regulatory particle, non-ATPase-like*) (Sharon *et al.*, 2006; Navon & Ciechanover, 2009). Diese bilden einen Ring und interagieren direkt mit dem 20S CP, wodurch dem Substrat der Zugang in den katalytischen 20S-Kernpartikel ermöglicht wird. Der Lid besteht aus neun Untereinheiten. Die Untereinheit Rpn11 enthält homolog zu CSN5 eine MPN-Domäne (JAMM-Motiv), welche eine deubiquitinierende Aktivität trägt (Verma *et al.*, 2002). Das Ubiquitin der markierten Substrate wird ebenfalls am 19S Partikel durch assoziierte Ubiquitinhydrolasen abgespalten (Hendil *et al.*, 2009). Des Weiteren weist der Lid Homologien zum COP9-Komplex wie auch zum eIF3 auf (Henke *et al.*, 1999; Cheng, 2009; Pick *et al.*, 2009).

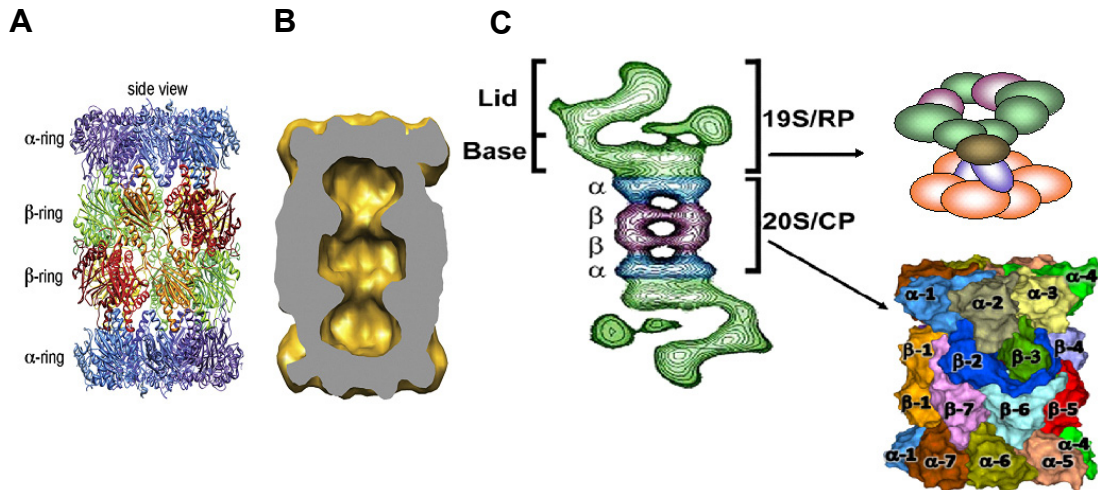


Abbildung 8: Das 20S/26S Proteasom. A) Struktur des 20S Proteasoms in Hefe. Die äußeren α -Ringe und die inneren β -Ringe (Cheng, 2009). B) 20S Proteasom in Hefe. Erkennbar sind die drei Kammern, die durch die α -Ringe und β -Ringe gebildet werden (Cheng, 2009). C) 2D Model des 26S Proteasoms. Der 20S-Komplex ist blau (α -Ringe) bzw. violett (β -Ringe), der 19S-Komplex ist grün dargestellt. Die α - bzw. β -Ringe bestehen aus je sieben Untereinheiten (nach Navon & Ciechanover, 2009, modifiziert).

1.3 Der Transkriptionsfaktor STAT1

1.3.1 Die Familie der STATs

Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) sind fähig, Signale von der Zellmembran in den Nukleus zu übertragen, um dort die Transkription bestimmter Zielgene zu induzieren. STATs können durch verschiedene Zytokine, Interleukine sowie auch durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation essentieller zellulärer Funktionen, wie bei der Steuerung der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation.

Die Familie der STATs besteht aus sieben Mitgliedern (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6), die etwa 600-750 AS groß sind. Sie kommen sowohl in Säugetieren als auch in verschiedenen Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* (Hou *et al.*, 1996) oder niederen Eukaryoten wie *Dictyostelium discoideum* (Kawata *et al.*, 1997) vor.

Tabelle 3: JAKs und STATs sowie verschiedene Zytokine, welche die Aktivität dieser Faktoren induzieren können (nach Leonard & O'Shea, 1998; Schindler & Plumlee, 2008).

| Ligand | JAKs | STATs |
|-------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------|
| <u>Typ I Zytokine</u> | | |
| IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 | JAK1, JAK3 | STAT3, STAT5a, STAT5b |
| IL-4 | JAK1, JAK3 | STAT6 |
| <u>gp130 Familie</u> | | |
| IL-6, IL-11 | JAK1, (JAK2) | STAT1, STAT3 |
| <u>Typ II Zytokine</u> | | |
| Typ I IFN α , IFN β , IFN ω | JAK1, TYK2 | STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 |
| Typ II IFN γ | JAK1, JAK2 | STAT1 |
| IL-10 | JAK1, TYK2 | STAT1, STAT3 |
| IL-19, IL-20 | JAK1, JAK2 | STAT1, STAT3 |

1.3.2 Die Struktur der STAT Proteine

STATs können in sieben funktionell konservierte Domänen unterteilt werden. Die N-terminale Domäne umfasst rund 125 AS und dient der Dimerisierung inaktiver unphosphorylierter STATs. Bei STAT3 und STAT5 dient sie der Interaktion mit Co-Aktivatoren wie CREB-Bindeprotein (CBP)/p300 oder c-Jun (Clevenger, 2004). Die *Coiled-Coil* Domäne dient der Bindung an regulatorische Proteine sowie dem nukleären Import und Export. Für die Bindung an eine spezifische palindrome GAS-Sequenz (*interferon gamma activated sequence*) im Promotorbereich der Zielgene ist die DNA-Bindedomäne (DBD) essentiell. Die Dimerisierung der STATs sowie die Bindung an das DNA Bindemotiv vermittelt die *Linker*-Domäne. Die Bindung an den Rezeptor und die Dimerisierung des aktiven STAT wird durch die hochkonservierte SH2-Domäne (Src homology 2) ermöglicht. Das Tyrosinaktivierungsmotiv befindet sich bei etwa 700 AS und beinhaltet einen konservierten Tyrosinrest der von fünf bis sieben spezifischen C-terminalen AS-Resten umgeben ist. Dieses Motiv liegt ebenfalls wie die SH2-Domäne an der Oberfläche des inaktiven Proteins und dient der JAK-abhängigen (Janus Kinase) Phosphorylierung. Nach der Phosphorylierung wird dieses Motiv vom Dimerisierungspartner erkannt und an dessen SH2-Domäne gebunden. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Komplexes, welche für die Aktivierung des Komplexes essentiell ist. Die transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD) befindet sich am C-Terminus und variiert sowohl in ihrer

Länge als auch in ihrer Sequenz innerhalb der STAT Familie. Diese Domäne ist von grundlegender Bedeutung für die Stabilität der STATs und beinhaltet einen Serinrest, welcher phosphoryliert werden kann (Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006; Schindler & Plumlee, 2008). Die Mitglieder der STAT-Familie können auch in unphosphorylierter Form Dimere bilden und liegen dann als Statosom in inaktiver Form im Zytoplasma vor (Lim & Cao, 2006).

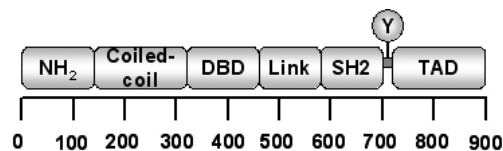


Abbildung 9: Die Struktur der STAT-Proteine. NH₂: N-terminale-Domäne, Coiled-coil: *coiled-coil*-Domäne, DBD: DNA Bindedomäne, Link: *Linker*-Domäne, SH2: SH2-Domäne, Y: Tyrosinrest, TAD: Transaktivierungsdomäne (nach Schindler & Plumlee, 2008)

1.3.3 Die Struktur und Funktion von STAT1

Bereits 1998 stellten Chen *et al.* die Kristallstruktur des phosphorylierten STAT1-Dimers dar. Die Form des Dimers ähnelt der eines Nussknackers. Die Struktur besteht aus vier α -Helices am N-Terminus, die der Protein-Protein Interaktion dienen und einem achtsträngigem „ β -barrel“, welches die DNA-Bindedomäne beherbergt. Ferner besitzt diese Struktur ein α -helikales Verbindungsstück und eine SH2-Domäne. Das unphosphorylierte STAT1-Dimer liegt hingegen in einer „bootähnlichen“ Form vor (Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006).

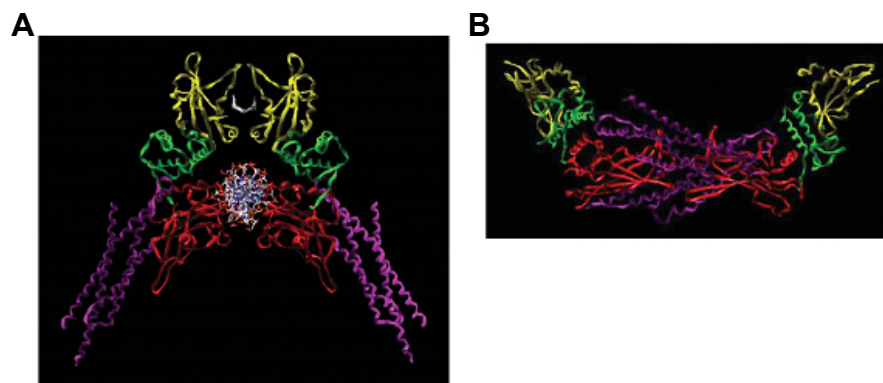


Abbildung 10: Die Kristallstruktur von STAT1. A) Die Kristallstruktur des „nussknackerförmigen“ phosphorylierten STAT1 Dimers. Die *coiled-coil* Domäne ist magenta-farbig dargestellt, die DBD rot, die *Linker* Domäne grün, die SH2 Domäne gelb, das phosphorylierte Tyrosin weiß. B) Die „bootförmige“ Struktur des unphosphorylierten STAT1 Dimers. Die Farben sind homolog zu A (Lim & Cao, 2006).

Das STAT1-Protein wird in zwei Isoformen, STAT1 α (91 kD) und STAT1 β (85 kD), exprimiert. Diese entstehen durch alternatives Spleißen. Dabei fehlen STAT1 β 39 AS der C-terminalen TAD (Schindler & Plumlee, 2008).

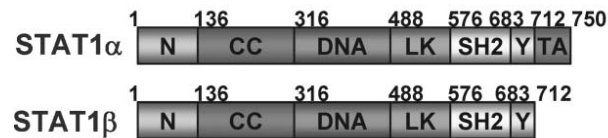


Abbildung 11: STAT1 α/β Proteine und ihre funktionellen Domänen. STAT1 wird alternativ gespleißt und kommt in zwei Isoformen vor. STAT1 β fehlen 39 AS am C-Terminus. N: N-terminale Domäne, CC: *coiled-coil* Domäne, DNA: DNA Bindedomäne, LK: *Linker* Domäne, SH2: SH2 Domäne, Y: Tyrosinrest, TA: Transaktivierungsdomäne (Lim & Cao, 2006).

1.3.4 Der JAK-STAT-Signalweg

Die Bindung von Zytokinen induziert die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren des Zytokinrezeptors. Dies führt zur Aktivierung rezeptorassoziierter Tyrosin-Kinasen, wie den Janus-Kinasen (JAK). In Säugetieren konnten vier JAKs mit einem Molekulargewicht von 120-130 kD identifiziert werden (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2). Sie beherbergen sieben JAK-homology (JH)-Domänen, von denen nur die JH1-Domäne über eine katalytische Aktivität verfügt. In ihr befindet sich ein regulatorisch essentieller Tyrosinrest. Die JH2-Domäne besitzt eine Pseudokinaseaktivität und kann mit den Mitgliedern der STAT-Familie interagieren (Schindler & Plumlee, 2008). Der N-terminale Bereich ist von grundlegender Bedeutung für die Bindung der Janus-Kinasen an den Zytokinrezeptor.

Durch die Autophosphorylierung eines Tyrosinrestes in der intrazellulären Domäne des Rezeptors wird die Bindung von inaktiven, zytoplasmatischen STAT-Monomeren über die SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest des Rezeptors ermöglicht. Im folgenden Schritt phosphorylieren die JAKs STAT an spezifischen Tyrosinresten. Die aktivierten STAT-Proteine dimerisieren durch reziproke Bindung des phosphorylierten Tyrosinrestes an der SH2-Domäne des Bindungspartners. Durch die Homo- bzw. Heterodimerisierung kann sich das aktivierte STAT-Dimer vom Rezeptor lösen und in den Nukleus translozieren. Dort wird die Transkription bestimmter Zielgene durch die Bindung von STAT an eine palindrome Bindestelle (GAS-Motiv) aktiviert. Die STAT-Dimere binden mit Hilfe ihrer DNA-Bindedomänen (DBD) an das GAS-Motiv (Konsensussequenz TTCN₂₋₄GAA), wodurch es zur Bildung tetramerer Strukturen kommt. Dieses erhöht die Affinität für die Bindung von

STAT an die Promotorregion (Leonard & O'Shea, 1998; Clevenger, 2004; Schindler & Plumlee, 2008). Ein weiteres STAT-Bindeelement ist ISRE (*IFN stimulated response element*). Es besitzt die Konsensussequenz AGTTTN₃TTTC. Daran bindet ein multimerer Komplex, genannt ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*), bestehend aus STAT1 α , STAT1 β , STAT2 und p48/IRF-9 (*interferon regulatory factor 9*) (Lim & Cao, 2006).

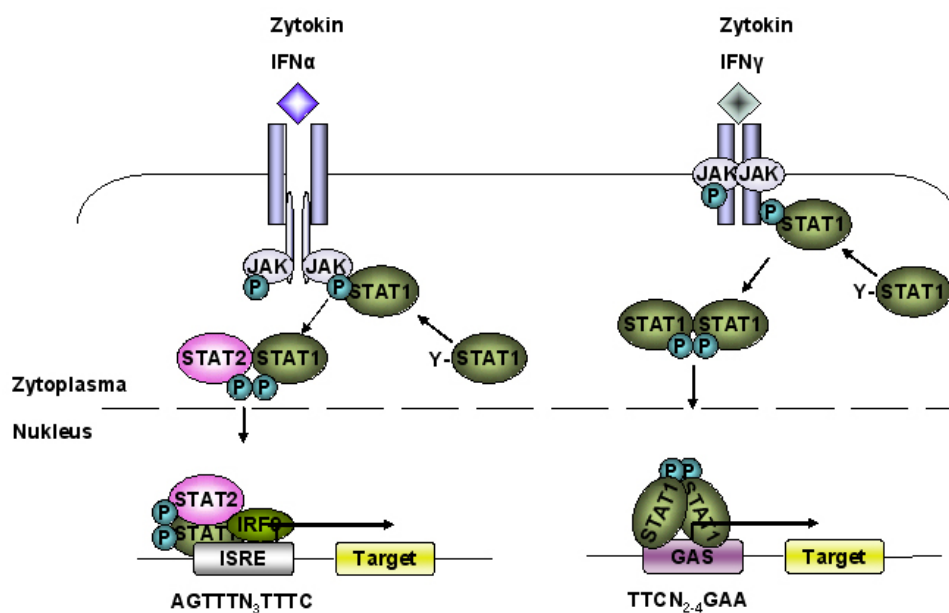


Abbildung 12: Der JAK-STAT-Signalweg. Durch die Bindung von IFN α an den Rezeptor kommt es zur Bildung von Heterodimeren aus STAT1 und STAT2. Diese bilden ISGF3 aus STAT1, STAT2 und IRF9, binden im Zellkern an ISRE-Elemente und aktivieren die Transkription der Zielgene. Die Bindung von IFN γ induziert die Bildung von STAT1-Homodimeren. Diese binden im Zellkern an GAS-Elemente und aktivieren die Transkription entsprechender Zielgene.

1.3.5 Die Regulation der STAT-Proteine

STAT-Proteine können post-translational, wie zum Beispiel über reversible Phosphorylierung, modifiziert werden (Lim & Cao, 2006). Ferner können STATs nach der Stimulation mit IFN γ ubiquitiniert und somit für den proteasomalen Abbau markiert werden. Eine weitere Modifikation stellt die ISGylierung dar. Dabei wird ISG15, ein ubiquitin-ähnliches Protein, das durch eine spezifische Protease gespalten und aktiviert. Die Bedeutung dieser Modifikationsform ist bislang unbekannt (Lim & Cao, 2006). Die SOCS (*suppressor of cytokine signaling*)-Familie besteht aus acht Mitgliedern, SOCS1-7 und CIS (*cytokine-inducible SH2-domain proteins*). Jedes SOCS Protein besitzt drei Domänen. Einen variablen N-terminalen

Teil, eine zentrale phosphotyrosin-bindende SH2-Domäne und ein konserviertes C-terminales SOCS-Boxmotiv, welches post-translationale Ubiquitinierung vermitteln kann. Die SOCS lagern sich nach der Liganden-Bindung an den Zytokinrezeptor an verschiedene JAKs. Dadurch regulieren sie die Aktivierung der STAT-Moleküle durch die Blockierung der STAT-Bindestellen in diesen JAKs.

Die Mitglieder der PIAS (*peptide inhibitors of activated STATs*)-Familie (PIAS1, PIAS3, PIASx und PIASy) binden an STATs und verhindern dadurch deren Bindung an die DNA. Beispielsweise bindet PIAS1 an STAT1 und moduliert so die Transkription von p53. Die Bindung erfolgt zwischen der N-terminalen Domäne von STAT1 und der *Linker*-Domäne von PIAS1. STAT1 kann ferner SUMOyliert werden. Dabei fungiert PIAS als E3-Ligase und knüpft SUMO (*s*mall *u*biquitin-*l*ike *m*odifier) an Lysin703. Durch IFN γ -Stimulation wird die SUMO-1-Konjugation an STAT1 erhöht. SUMOlierung kann die Funktion von Transkriptionsfaktoren wie STAT1 modulieren (Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006). Ferner wird phosphoryliertes STAT1 (Serin-phosphoryliert) durch das Skp1-Cul1-F-Box (β -TRCP) enthaltende CRL ^{β -TRCP} ubiquitiniert und infolgedessen proteasomal degradiert (Soond *et al.*, 2008).

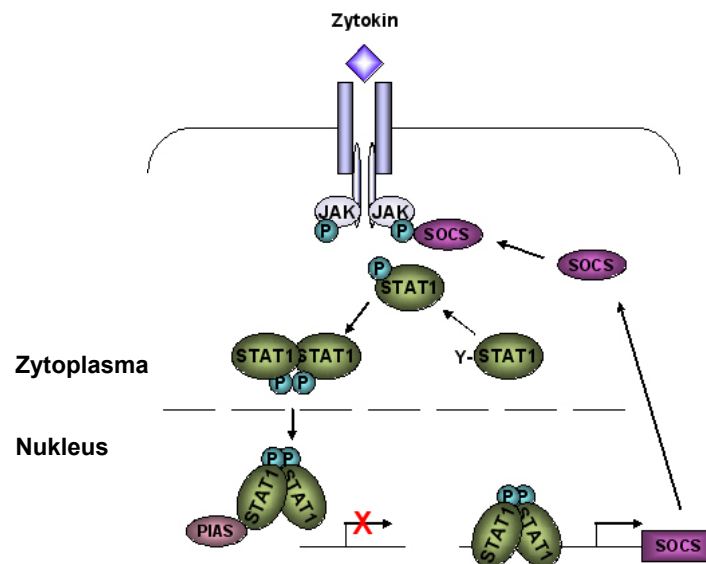


Abbildung 13: Die Inaktivierung von STAT durch SOCS bzw. PIAS. Die Bindung von Zytokinen löst den JAK-STAT-Signalweg aus. Aktivierte JAKs stellen Bindestellen für STATs und SOCS dar. Die Aktivierung und Dimerisierung von STAT1 führt zur Expression des SOCS/CIS Gens. Das Genprodukt wird zum Rezeptor rekrutiert und konkurriert dort mit STAT1 um die Bindestelle an der JAK und übt somit einen negativen Rückkopplungseffekt aus. PIAS bindet im Nukleus an das phosphorylierte STAT1-Dimer und verhindert somit dessen Bindung an die DNA.

1.4 MicroRNAs

1.4.1 Die Bedeutung von MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind eine Klasse von ca. 22 Nukleotiden langen, nichtkodierenden RNAs. Sie binden in der 3'UTR (*untranslated regions*) der Ziel-mRNA an *miRNA recognition elements* (MRE) und regulieren bzw. reprimieren diese dadurch. Die meisten miRNAs besitzen ihre eigenen Promotoren nahe der Promotorregionen ihrer Zielgene. Nach der Transkription der miRNAs werden diese post-transkriptionell durch *5'-Methylguanosin-Capping* und Anhängen eines Poly-A-Schwanzes modifiziert. Die primäre miRNA (*pri-miRNA/ primary miRNA*) besitzt eine Haarnadelstruktur. Diese wird vom RNaseIII-Enzym Drosha und dem RNA-bindenden Pasha (DGCR8) prozessiert. Dabei bildet Drosha das katalytische Zentrum und schneidet eine 70-80 Nukleotide lange, doppelsträngige (ds) RNA mit zwei Nukleotiden Überhang am 3' Ende aus der Haarnadelstruktur heraus. Die dabei entstandene prä-miRNA (*precursor miRNA*) wird mittels Exportin-5, welches an den entstandenen 3' Überhang bindet, unter Mithilfe von Ran-GTP aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert. Dabei wird Ran-GTP durch das zytoplasmatische Ran-GTPase-Aktivierungsprotein zu Ran-GDP hydrolysiert. Anschließend bindet Dicer (dsRNA schneidende RNaseIII) den Nukleotidüberhang der prä-miRNA und prozessiert die prä-miRNA in 22 Nukleotide lange dsRNA. In humanen Zellen bindet Argonaut 2 (Ago2) an Dicer und das RNA-bindende Protein TRBP. Dieses führt zur Bildung des *RISC-loading Komplexes* (RLC). Dieser ist essenziell, um die miRNA auf Ago2 zu übertragen. Ago2, ein Bestandteil von RISC (*RNA-induced silencing complex*) bzw. miRNPs (*microribonucleoprotein*), bindet einen Strang der Duplex-miRNA. Dieser wird von Ago2 unter ATP-Verbrauch gespalten, so dass sich der Einzelstrang mit komplementären Abschnitten der mRNA paaren kann. Dieser Komplex reguliert die Translation seiner Zielgene möglicherweise durch die Bindung des RISC an Polyribosomen. Dadurch wird die Translation der mRNA des Zielgens angehalten (Carmell & Hannon, 2004; Cullen, 2004; Murchison & Hannon, 2004; Kiriakidou *et al.*, 2007; Roush & Slack, 2008; Wang *et al.*, 2009). Eine weitere Hypothese besagt, dass das Argonaut-Protein Ago2, Bestandteil des RISC/miRNP-Komplexes, an multiple MRE in der mRNA des Zielgens bindet. Dabei kompetetiert Ago2 mit eIF4E (eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor) um die Bindung an der Methylguanosinkappe der Ziel-mRNA. Kommt Ago2 im Überschuss vor, bindet die

Methylguanosinkappe der mRNA bevorzugt an Ago2. Daraus resultiert eine Inhibition der Translation (Pillai *et al.*, 2005; Kiriakidou *et al.*, 2007).

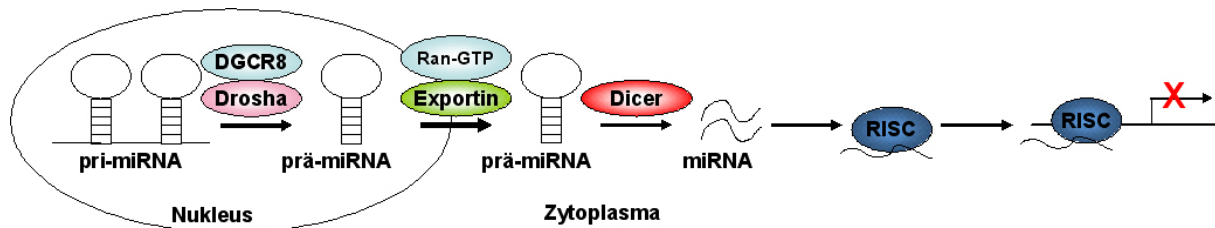


Abbildung 14: Der miRNA Pathway. Das Primärtranskript (pri-miRNA) wird durch Drosha (RNaseIII-Nuklease) in prä-miRNA prozessiert. Exportin transportiert die prä-miRNA unter Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP ins Zytoplasma. Dort schneidet die Nuklease Dicer aus der prä-miRNA eine ca. 22 Nukleotide lange doppelsträngige miRNA heraus. Diese wird von RISC gebunden. Einer der Einzelstränge wird in den RISC-Komplex inkorporiert.

1.4.2 Die let-7-Familie

Bei der Untersuchung von Mutanten in *Caenorhabditis elegans*, die Defekte in der Regulation der Larvalentwicklung aufwiesen, wurden zwei Familien von miRNAs entdeckt und als let-7 (*lethal-7*) sowie lin-4 bezeichnet (Cullen, 2004). Zunächst wurde vermutet, dass let-7 ausschließlich an der Entwicklung von *C. elegans* beteiligt ist. Die neue Klasse von Regulatoren wurde daher zunächst stRNA (*small temporal RNA*) genannt. Diese Art von RNA wurde ferner in Würmern, Fliegen und menschlichen Zellen detektiert. Heute weiß man, dass diese Klasse von RNAs die Expression einer Vielzahl von Zielgenen steuert (Torrisani *et al.*, 2007).

Im humanen Genom existieren 12 Loci, die in Clustern auf acht Chromosomen organisiert sind, welche miRNAs der let-7-Familie kodieren. Zur let-7-Familie gehören let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i und miR-98. Let-7 fungiert als Tumorsuppressor, indem es RAS, HMGA2 und c-Myc reguliert (Park *et al.*, 2007; Heo *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009).

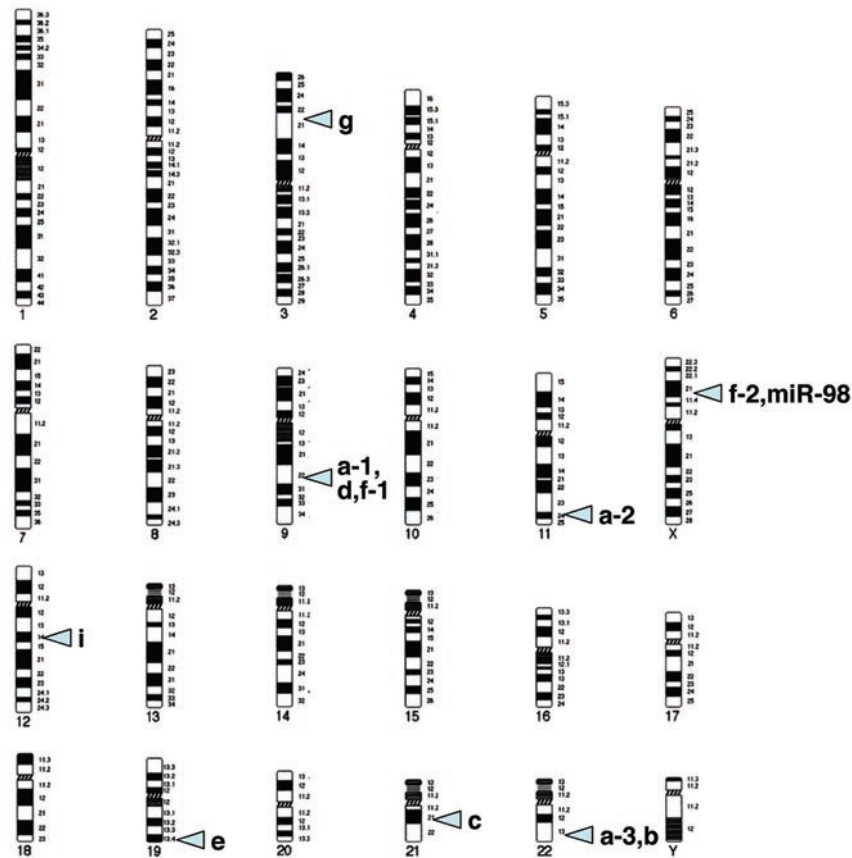


Abbildung 15: Die Lokalisation der Gene der let-7-Familie. Die Gene der Mitglieder der let-7-Familie sind in Clustern auf acht Chromosomen lokalisiert (Park *et al.*, 2007).

Tabelle 4: Die Lokalisation der CSN-Untereinheiten, c-Myc, STAT1 und der Mitglieder der let-7-Familie im humanen Genom und deren Locus (Quelle: NCBI, *National Center for Biotechnology Information*). Die Mitglieder der let-7-Familie befinden sich in Clustern auf acht Chromosomen. Sie sind jedoch auf anderen Chromosomen als die CSN-Untereinheiten, c-Myc und STAT1 kodiert.

| Gen | Chromosom | Locus | Gen | Chromosom | Locus |
|-------|-----------|----------|----------|-----------|----------|
| CSN1 | 17 | 17q25.3 | let-7-a1 | 9 | 9q22.32 |
| CSN2 | 15 | 15q21.2 | let-7-a2 | 11 | 11q24.1 |
| CSN3 | 17 | 17p11.2 | let-7-a3 | 22 | 22q13.31 |
| CSN4 | 4 | 4q21.22 | let-7b | 22 | 22q13.31 |
| CSN5 | 8 | 8q13.1 | let-7c | 21 | 21q21.1 |
| CSN6 | 7 | 7q22.1 | let-7d | 9 | 9q22.32 |
| CSN7A | 12 | 12p13.31 | let-7e | 19 | 19q13.41 |
| CSN7B | 2 | 2q37.1 | let-7f-1 | 9 | 9q22.32 |
| CSN8 | 2 | 2q37.1 | let-7f-2 | X | Xp11.22 |
| c-Myc | 8 | 8q24.21 | let-7g | 3 | 3p21.11 |
| | | | let-7i | 12 | 12q14.1 |
| STAT1 | 2 | 2q32.2 | miR-98 | X | Xp11.22 |

In Wirbeltieren existieren zwei Gene Lin28 (Lin28A) und Lin28B, die in *C. elegans* entdeckt wurden und mit let-7 interagieren. Die RNA-bindenden Proteine Lin28 und Lin28B sind zytoplasmatisch lokalisiert und dienen als selektive post-transkriptionelle Repressoren von let-7, welche dessen Biogenese inhibieren (Piskounova, 2008; Viswanathan *et al.*, 2008; Hagan *et al.*, 2009). Dabei vermittelt Lin28 eine terminale Uridylierung durch Bindung an prä-let-7 miRNAs. Diese führt zur Rekrutierung der terminalen Uridyl-Transferase (TUTase: Zcchc11/TUT4), die an ein Tetranukleotid-Sequenz Motiv (GGAG) bindet und den Poly-U-Schwanz anfügt. Das Anhängen des Poly-U-Schwanzes am 3'Ende der prä-miRNA inhibiert die Dicer-Aktivität und markiert let-7 für den Abbau (Heo, 2008; Hagan, 2009). In *C. elegans* wird die Uridylierung durch Lin28 und die Poly-U-Polymerase PUP-2 reguliert (Heo, 2009; Lehrbach *et al.*, 2009). Die let-7 Primärtranskripte werden in *C. elegans* an der SL (*spliced leader*)-Sequenz am 5'Ende der mRNAs gespleißt. Dadurch wird die Struktur der miRNA-Primärtranskripte beeinflusst und Strukturen entfernt, die bei der Reifung der miRNA stören (Bracht *et al.*, 2004).

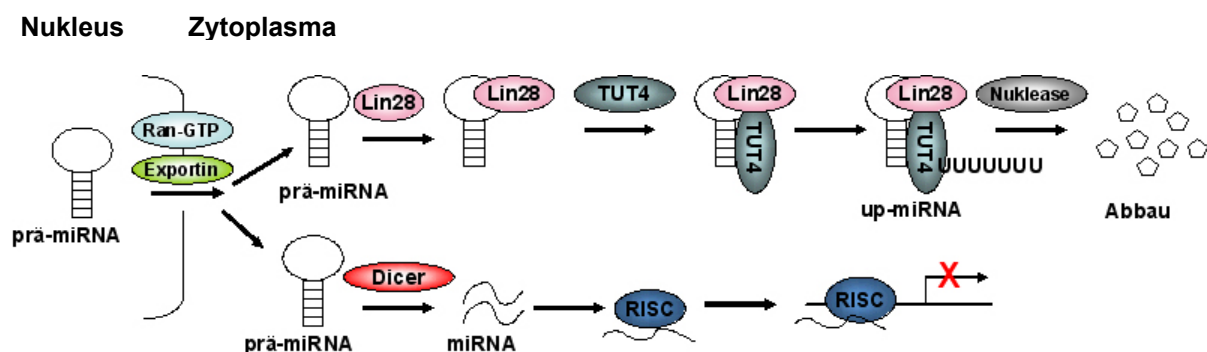


Abbildung 16: Model der Reifung und Regulation von let-7. Die prozessierte prä-miRNA wird ins Zytoplasma transportiert. Dort wird sie entweder von Dicer in reife miRNA überführt, die in RISC inkorporiert wird und auf Ziel-mRNA wirken kann. Des Weiteren kann sie von Lin28 gebunden werden. Dieses induziert durch Rekrutierung einer TUTase (Zcchc11 bzw. TUT4) die Poly-Uridylierung. Der Poly-U-Schwanz der up-miRNA (uridylierte prä-miRNA) ist ein Signal zur Degradation der miRNA (nach Heo *et al.*, 2008 & Heo *et al.*, 2009).

1.4.3 c-Myc und dessen Wechselwirkungen mit let-7

Das Proto-Onkogen c-Myc ist ein Regulator der Expression bestimmter Zielgene. Ferner ist es an zellulären Prozessen wie der Apoptose, Differenzierung der Zelle oder der Zellproliferation beteiligt (Sears, 2004). Als Transkriptionsaktivator dimerisiert es mit Max (*myc-assoziiierter Faktor X*) sowie weiteren DNA-Bindeproteinen und aktiviert die Transkription verschiedener Zielgene (Eilers &

Eisenman, 2008; Meyer & Penn, 2008). Am N-terminalen Terminus von c-Myc befindet sich seine Transaktivierungsdomäne. In dieser Region befinden sich Threonin- und Serin-Reste (Thr58; Ser62), an denen c-Myc durch die GSK3 (*glycogen synthase kinase*) bzw. CDK Kinase phosphoryliert werden kann. Diese Modifikationen regulieren die Aktivität und Stabilität von c-Myc. Aufgrund von äußeren, proliferativen Stimuli wird c-Myc am Serin-Rest (Ser62) phosphoryliert. Diese Modifikation erhöht die Stabilität des Transkriptionsfaktors (Dang *et al.*, 1999; Meyer & Penn, 2008). Die Phosphorylierung des Threonin-Restes (Thr58) durch die GSK3-Kinase bewirkt die Bindung des CRL^{FBW7}-Komplexes und resultiert in der Ubiquitinierung und dem folgenden proteasomalen Abbau von c-Myc (Sears, 2004; Welcker *et al.* 2004; Meyer & Penn, 2008; Kitagawa *et al.*, 2009). Der C-Terminus beherbergt eine *helix-loop-helix leucine zipper-Domäne* (HLH/LZ), über welche c-Myc mit Max interagieren kann. Ferner kann das Myc/Max-Dimer über die Transaktivierungsdomäne von c-Myc an Bindestellen von dessen Zielgenen binden und deren Transkription aktivieren. Dabei bindet das Dimer mit hoher Affinität an E-Boxen mit dem Konsensusmotiv 5'-CACGTG-3' (Dang *et al.*, 1999; Meyer & Penn, 2008).

Die Aktivierung der Genexpression von c-Myc wird durch β -Catenin reguliert. Die Aktivität von β -Catenin wird über den Wnt-Signalweg gesteuert. Dabei wird β -Catenin in Abwesenheit von Wnt durch die GSK3 Kinase phosphoryliert und für den proteasomalen Abbau markiert. In Anwesenheit von Wnt kommt es zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Daraufhin wird β -Catenin in den Nukleus transportiert, wo es nach Bindung des Transkriptionsfaktors Tcf/Lef die Transkription seiner Zielgene, wie z. B. c-Myc, aktiviert (Dang *et al.*, 1999; Kikuchi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2009).

Die Expression der Myc-Familie wird von RNA-bindenden Proteinen (RBP) und miRNAs post-transkriptionell reguliert (Sampson *et al.*, 2007). Das RBP HuR (*human antigen R*) rekrutiert let-7/RISC an spezielle Bereiche der 3'UTR der c-Myc mRNA, bindet dort und reprimiert dessen Translation. Dieser Vorgang ist abhängig vom HuR Level. Ist der HuR Gehalt der Zelle hoch, wird die c-Myc-Translation reprimiert. Ist hingegen wenig HuR vorhanden, wird die Affinität von let-7/RISC zur 3'UTR von c-Myc reduziert und c-Myc translatiert (Kim *et al.*, 2009).

Die Aktivierung von c-Myc führt zu einer Repression vieler miRNA Gene, wie die der let-7-Familie. Dabei bindet c-Myc an den Promotor dieser Gene und reprimiert so die

Transkription dieser Gene. Des Weiteren bindet c-Myc den Lin28B Promotor und aktiviert dessen Transkription. Das RNA-bindende Protein Lin28B kann mit der Schleifenregion der Haarnadelstruktur der let-7 Vorläuferform interagieren und dessen Prozessierung inhibieren (Chang *et al.*, 2009; Kenneth & White, 2009).

2. Zielsetzung

Das COP9 Signalosom ist ein hochkonservierter Proteinkomplex, bestehend aus acht Untereinheiten. Es ist ein wichtiger Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Dabei vermittelt die Untereinheit CSN5 des Signalosoms die Abspaltung des ubiquitin-ähnliche Proteins Nedd8 und reguliert somit die Stabilität und Aktivität der Cullin RING Ubiquitin Ligasen. Die Funktion und der Aufbau des CSN sind aufgrund vieler Studien gut untersucht worden. Der Mechanismus der Biogenese und der Assemblierung ist bis heute jedoch unbekannt. In der hier vorgelegten Promotionsarbeit sollte die Regulation der Biogenese des COP9 Signalosoms untersucht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Anhaltspunkte über mögliche an der Biogenese beteiligte Faktoren. Durch Vorversuche konnte lediglich eine Co-Regulation der CSN-Untereinheiten durch die Überexpression einzelner Untereinheiten auf Proteinebene in HeLa-Zellen gezeigt werden. Zunächst sollten durch weitere Überexpressionsversuche mögliche Regulatoren der CSN-Biogenese definiert werden. Durch geeignete Experimente sollten diese im Folgenden charakterisiert werden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen waren:

- Gibt es Faktoren, welche die Biogenese des CSN beeinflussen?
- Wie werden diese Faktoren reguliert?
- Wie wird die Biogenese der CSN-Untereinheiten koordiniert und gesteuert?

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| Aceton | Roth (Karlsruhe, D) |
| AG490 | Calbiochem (Darmstadt, D) |
| AG9 | Calbiochem (Darmstadt, D) |
| Agar | Applichem (Darmstadt, D) |
| Agarose | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich (München, D) |
| APS | Roth (Karlsruhe, D) |
| ATP | Invitek (Berlin, D) |
| BSA | Roth (Karlsruhe, D) |
| CaCl ₂ | Applichem (Darmstadt, D) |
| DEPC | Roth (Karlsruhe, D) |
| DMSO | Applichem (Darmstadt, D) |
| EDTA | Applichem (Darmstadt, D) |
| Essigsäure | Applichem (Darmstadt, D) |
| Ethanol 70%, vergällt | Applichem (Darmstadt, D) |
| Ethanol 96% | Applichem (Darmstadt, D) |
| Ethidiumbromid | Roche (Mannheim, D) |
| G418 | Calbiochem (Darmstadt, D) |
| Glukose | Applichem (Darmstadt, D) |
| Glycerin | Roth (Karlsruhe, D) |
| Glycin | Applichem (Darmstadt, D) |
| Hefeextrakt | Applichem (Darmstadt, D) |
| IFN α 2b (rekombinant) | Biomol (Hamburg, D) |
| IFN γ (rekombinant) | Biomol (Hamburg, D) |
| Isopropanol | Applichem (Darmstadt, D) |
| KCl | Applichem (Darmstadt, D) |
| KH ₂ PO ₄ | Applichem (Darmstadt, D) |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| Lipofectamine LTX & Plus Reagent | Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| Methanol | Applichem (Darmstadt, D) |

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| MgCl ₂ | Applichem (Darmstadt, D) |
| Milchpulver | Applichem (Darmstadt, D) |
| Na ₂ HPO ₄ | Applichem (Darmstadt, D) |
| Natriumazid | Applichem (Darmstadt, D) |
| NaOH | Applichem (Darmstadt, D) |
| NaCl | Applichem (Darmstadt, D) |
| Natriumdesoxycholat | Applichem (Darmstadt, D) |
| NP-40 | Applichem (Darmstadt, D) |
| Orange G | Applichem (Darmstadt, D) |
| PMSF | Roth (Karlsruhe D) |
| Polyacrylamid | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ponceau | Applichem (Darmstadt, D) |
| Puromycin | Applichem (Darmstadt, D) |
| SDS | Serva (Heidelberg, D) |
| TCA | Applichem (Darmstadt, D) |
| Temed | Roth (Karlsruhe, D) |
| Tris | Applichem (Darmstadt, D) |
| Triton X-100 | Applichem (Darmstadt, D) |
| Trypton | Applichem (Darmstadt, D) |
| Tween 20 | Applichem (Darmstadt, D) |

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | | |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
| 96-well Platten | Microplates | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| Acrylküvetten | Plastibrand, UV Küvette Micro | Brand (Wertheim, D) |
| ECL | ECL | Pierce/ Thermo Scientific (Rockland, USA) |
| dNTPs | je 10 mM | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Feindosierungsspritzen | Omnifix- F 1 ml | Braun (Melsungen, D) |
| Filterpapier | Blotting paper 703 | VWR (Darmstadt, D) |

| | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gradienten-Gel & Native Buffer Strips | 4-15 % Gradient Gel | GE-Healthcare (Uppsala, S) |
| Nitrocellulosemembran | Protran | Whatman (Dassel, D) |
| Pipettenspitzen | 10 µl, 100 µl, 1 ml 10 µl; 100 µl; 1 ml Multi guard | Sarstedt (Nümbrecht, D) Roth (Karlsruhe, D) |
| Reaktionsgefäße | 0,1 ml strip-tubes & caps 500 µl 1,5 ml, 2 ml 1,5 ml Bio-Cert 15 ml, 50 ml | ITF-Labortechnik (Wasserburg, D) Eppendorf (Hamburg, D) Sarstedt (Nümbrecht, D) Roth (Karlsruhe, D) Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| Röntgenfilme | X-Omat UV-Film | Kodak, Fa. Bode (Berlin, D) |
| SDS-Ladepuffer | Roti-Load1 | Roth (Karlsruhe, D) |
| Ultrazentrifugenröhrchen | Polyclear Röhrchen | BeraneK (Weinheim, D) |
| Zellkulturschalen | 12-well; 6-well; 10 cm; 14,5 cm | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |
| Zellschaber | | Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) |

3.1.3 Kits

| | | |
|------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Gelextraktionskit | Gene Matrix Agarose Out DNA Purification Kit | EURx (Gdansk, Pl) |
| Plasmid-Isolations-Kit | Invisorb Spin Plasmid Mini Two Endofree Plasmid Maxi Kit | Invitek (Berlin, D) Qiagen (Hilden, D) |
| Protein-Assay-Kit | D _C Protein Assay | Bio-Rad Laboratories (München, D) |
| RNA-Isolations-Kit | RNeasy Mini 50 | Qiagen (Hilden, D) |

3.1.4 Enzyme

| | | |
|-----------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| DNA-Polymerase | Opti-Taq Polymerase | Roboklon (Berlin, D) |
| DNaseI | DNaseI | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Real-Time PCR Polymerase | Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR GreenI | Roche (Mannheim, D) |
| Reverse Transkriptase | M-MLV RNase H minus point mutant | Promega (Mannheim, D) |
| RNasin | RNasin | Promega (Mannheim, D) |

3.1.5 Größenstandards

| | | |
|------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
| DNA-Größenstandard | Gene Ruler 100 bp DNA ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| | Gene Ruler 1 kb DNA ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |
| Protein-Größenstandard | PAGE Ruler prestained protein ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, D) |

3.1.6 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Biotez (Berlin, D) synthetisiert. In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Primerpaare für die cDNA-Synthese, die semiquantitative PCR bzw. die quantitative Real-Time PCR aufgeführt.

Tabelle 5: Die verwendeten Primer für die semiquantitative PCR bzw. für die cDNA-Synthese.

| Primer | vorwärts 5'-3' | rückwärts 5'-3' |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|
| Oligo dT | TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV | |
| ACTB | AAT CTG GCA CCA CAC CTT CTA C | ACT CGT CAT ACT CCT GCT TGC T |
| CSN1 | GAA CTA CAA GGG CAA CTC CAT C | GGG ACT TGA CAT GGA TCT GG |

Tabelle 6: Die verwendeten Primer für die quantitative Real-Time PCR.

| Primer | vorwärts 5'-3' | rückwärts 5'-3' |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|
| RT ACTB | GGG ACC TGA CTG ATC ACC TCA | AGG CAG CTC GTA GCT CTT CTC |
| RT c-Myc | CAG CGA CTC TGA GGA GGA AC | GGA TAG TCC TTC CGA GTG GAG |
| RT CSN1 | TCT CCA GCA GCT CCT TCA AGT TGT | TGA AAT ACT GGA TGA GGG CAC GGT |
| RT CSN2 | TAC GCC AGT TAC ATC AGT CGT G | CTC CCA TAA TCA GTG GAT GAG G |
| RT CSN5 | GAA CTG GCC AAC ATG CAG GAA | AGA CCC ATC ACT TCC AAG TTG CCT |
| RT CSN6 | TCG AGG TGA TGA ACT CCT TTG A | AAA CTC CAG CTC CTT GAA CAC C |
| RT CSN8 | CTT TGC CCT GGT CTC TCA AG | CCG TCA GTC TGG CTA ACT GCT |
| RT STAT1 | CCG TTT TCA TGA CCT CCT GT | TGA ATA TTC CCC GAC TGA GC |

3.1.7 Primärantikörper

| | |
|------------------|------------------------------------------------------------------|
| Anti-ACTB | Maus, monoklonal, WB 1:10000, Santa Cruz (Heidelberg, D) |
| Anti-c-Myc | Kaninchen, polyklonal, WB 1:1000, Santa Cruz (Heidelberg, D) |
| Anti-CSN1 | Kaninchen, polyklonal, WB 1:5000, Enzo Life Science (Lörrach, D) |
| Anti-CSN2 | Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Uhle <i>et al.</i> , 2003 |
| Anti-CSN5 | Maus, monoklonal, WB 1:5000, von B. Christy |
| Anti-CSN6 | Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Enzo Life Science (Lörrach, D) |
| Anti-CSN7a | Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Uhle <i>et al.</i> , 2003 |
| Anti-CSN8 | Kaninchen, polyklonal, WB 1:3000, Enzo Life Science (Lörrach, D) |
| Anti-Cul1 | Kaninchen, polyklonal, WB 1:500, Santa Cruz (Heidelberg, D) |
| Anti-Flag | Maus, monoklonal, WB 1:1000 Sigma Aldrich (München, D) |
| Anti-Gankyrin | Kaninchen, polyklonal, 1:1000, Enzo Life Science (Lörrach, D) |
| Anti-Lin28B | Kaninchen, polyklonal, 1:60, Abcam (Cambridge, UK) |
| Anti-PSMD5 | Ziege, polyklonal, 1:1000, Santa Cruz (Heidelberg, D) |
| Anti-STAT1 | Maus, monoklonal, WB 1:500, Santa Cruz (Heidelberg, D) |
| Anti-STAT1(Y701) | Maus, monoklonal, WB 1:2000, Zymed (San Francisco, USA) |

3.1.8 Sekundärantikörper

| | |
|--------------------|---------------------------------------|
| Anti-Kaninchen POD | WB 1:2000, Seramun (Heidesee, D) |
| Anti-Maus POD | WB 1:2000, Seramun (Heidesee, D) |
| Anti-Ziege POD | WB 1:2000, Sigma Aldrich (München, D) |

3.1.9 3.1.9 Vektoren

| | |
|--------------------|------------------------------------------------------|
| pcDNA3.1 Flag | Michael Naumann (Magdeburg, D) |
| pcDNA3.1 Flag-CSN2 | Huang <i>et al.</i> , 2005 |
| pcDNA3.1 HisC | Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| pcDNA3.1 HisC-CSN1 | Peth <i>et al.</i> ² , 2007 |
| pSuperCTL | Oliver Krämer (Krämer <i>et al.</i> , 2006)(Jena, D) |
| pSupersiSTAT1 | Oliver Krämer (Krämer <i>et al.</i> , 2006)(Jena, D) |

3.1.10 verwendete siRNA

Tabelle 7: Der Name, die Sequenz und die Herkunft der verwendeten siRNAs.

| siRNA | Sequenz | Hersteller |
|------------|---------------------------|------------------------------|
| Lin28b si1 | GGA AGG AUU UAG AAG CCU A | MWG (Ebersberg, D) |
| Lin28b si2 | GCA GAG AUC UCA GAA CGG U | MWG (Ebersberg, D) |
| siGFP | GCA GAA GAA CGG CAU CAA G | Schulze <i>et al.</i> , 2005 |
| siC-Myc | | von W. Henke |

3.1.11 verwendete miRNA Hairpin Inhibitoren

Tabelle 8: Der Name und die Herkunft der verwendeten miRNA Hairpin Inhibitoren.

| miRNA Inhibitor | Hersteller |
|---------------------------------------|------------------------|
| let-7-a1 | Dharmacon (Surrey, UK) |
| let-7c | Dharmacon (Surrey, UK) |
| let-7e* | Dharmacon (Surrey, UK) |
| let-7f | Dharmacon (Surrey, UK) |
| let-7i | Dharmacon (Surrey, UK) |
| Hairpin Inhibitor Negative Control #1 | Dharmacon (Surrey, UK) |

3.1.12 verwendete miRNA-Mimics

Tabelle 9: Der Name und die Herkunft der verwendeten miRNA-Mimics.

| miRNA-Mimics | Hersteller |
|---------------------------|------------------------|
| let-7-a1 | Dharmacon (Surrey, UK) |
| Mimic Negative Control #1 | Dharmacon (Surrey, UK) |

3.1.13 Puffer

| | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 x DNA Ladepuffer | 50 % (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,4 % (w/v) Xylen-Orange G in 1 x TAE |
| 10 x TAE | 40 mM Tris; 20 mM EDTA; Essigsäure, pH 8,5 |
| Blotpuffer | 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % (v/v) Methanol, pH 8,3 |
| Magermilchlösung | 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS |
| Monolysispuffer | 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 2 mM ATP; 5 mM MgCl ₂ ; 10 µg/ml Aprotinin; 1 mM PMSF |
| PBS | 8 g NaCl; 1,35 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,2 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (in 1 Liter) |

| | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBST | PBS + 0,1 % Tween 20 |
| Ponceaufärbelösung | 0,2 % Ponceau S; 5 % Trichloressigsäure |
| Puffer A | 20 mM Tris; 50 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerol; 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,2 |
| Puffer B3 | 20 mM Tris; 50 mM KCl; 40 % (v/v) Glycerol; 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,2 |
| SDS-Laufpuffer | 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS |
| Strippingpuffer | 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7; 100 mM β -Mercaptoethanol; 2 % SDS |
| Triplelysispuffer | 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,5 % Natriumdesoxycholat; 0,1 % SDS; 1 % NP-40; 0,02 % Natriumazid; 10 μ g/ml Aprotinin; 1 mM PMSF |

Sämtliche Puffer wurden mit A. dest angesetzt.

3.1.14 Medien

| | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LB | 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % NaCl, pH 7,5 |
| LB-Agar | LB-Medium mit 1,5 % Agar |
| SOC-Medium | 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl, pH 7,0; 10 mM $MgCl_2$; 20 mM Glukose |

Dem Medium wurde zur Selektion Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugefügt.

3.1.15 Zellkulturmedien und Zusätze

| | |
|-------------------------|---------------------------|
| Isocove's MEM | Biochrom (Berlin, D) |
| FCS | Biochrom (Berlin, D) |
| L-Glutamin | Biochrom (Berlin, D) |
| Opti-MEM1 + Glutamax1 | Gibco (Karlsruhe, D) |
| PBS | Biochrom (Berlin, D) |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco (Karlsruhe, D) |
| RPMI 1640 | Biochrom (Berlin, D) |
| Trypanblau | Roche (Mannheim, D) |
| Trypsin/EDTA | Invitrogen (Karlsruhe, D) |

3.1.16 *Escherichia coli* Stämme

DH5α Invitrogen (Karlsruhe, D)

3.1.17 Eukaryotische Zelllinien

B8-CSN2 adhärente, murine Fibroblastenzelllinie, stabil mit Flag-CSN2 transfiziert

B8-Flag adhärente, murine Fibroblastenzelllinie, stabil mit Flag-Leervektor transfiziert

HeLa adhärente, humane Cervixkarzinomzelllinie

siCSN1 adhärente, humane Cervixkarzinomzelllinie (HeLa), stabil transfiziert mit siCSN1-Vektoren

siGFP adhärente, humane Cervixkarzinomzelllinie (HeLa), stabil transfiziert mit siGFP-Vektoren

3.1.18 Geräte

| | | |
|--------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Agarosegelkammer | horizontal | Renner GmbH (Dannstadt, D) |
| Bilddokumentation | UV-Systeme | Intas (Göttingen, D) |
| Feinwaage | BP221S | Sartorius (Göttingen, D) |
| Heizbad | 1092 | GFL (Burgwedel, D) |
| Inkubator (Zellkultur) | Hera Cell | Heraeus (Hanau, D) |
| Kühlzentrifuge | Megafuge 1.0R | Heraeus (Hanau, D) |
| Magnetrührer | MR 3001 K | Heidolph (Schwabach, D) |
| Mikroskop | Wilovet S | Hund (Wetzlar, D) |
| Mikrotiterplattenscanner | Synergy HT | Bio TEK (Bad Friedrichshall, D) |
| Nativgelelektrophorese | Phast System | Pharmacia Biotec (Uppsala, S) |
| PCR-Thermocycler | T Personal | Biometra (Göttingen, D) |
| pH-Meter | WTW pH330 | WTW (Weilheim, D) |
| Photometer | Ultraspec 1000 | Pharmacia Biotec (Uppsala, S) |
| Power Supplier | Power Pac 300 | Bio-Rad (München, D) |
| Pumpe | LKB Pump P-1 | Pharmacia Biotec (Uppsala, S) |
| Real-Time PCR Cycler | RG 3000 | Corbett Research (Mortlake, Aus) |
| Schüttler | Unimax 2010 | Heidolph (Schwabach, D) |

| | | |
|---------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
| SDS-PAGE System | Mini Protean Cell 3 | Bio-Rad (München, D) |
| Tischzentrifuge | Biofuge fresco Fresco 17 | Heraeus (Hanau, D) Heraeus (Hanau, D) |
| Ultrazentrifuge | L7-55 Ultracentrifuge Rotor: SW40 | Beckman Coulter (Krefeld, D) |
| Vortexer | Reax control | Heidolph (Schwabach, D) |
| Waage | BP610 | Sartorius (Göttingen, D) |
| Wasserbad | C10 | Haake (Karlsruhe, D) |
| Western Blot-System | Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell | Bio-Rad (München, D) |
| Zellkulturbank | PEA | PEA (Koblenz, D) |

3.1.19 verwendete Software

| | | |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|
| Microtiterplatterscanner | KC4 V3.4 | Bio TEK (Bad Friedrichshall, D) |
| Real-Time PCR | Rotor Gene Version 4.6 | Corbett Research (Mortlake, Aus) |
| Statistik | GraphPad Prism 4 Version 4.03 | GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA) |

3.1.20 verwendete Software für die miRNA-Analyse

| | | |
|----------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MicroCosm | Targets Version 5 | http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/ |
| MicroInspector | Version 1.5 | http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/ |
| miRBase Sanger | microRNA Database | http://www.mirbase.org/ |

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Anzucht von *E. coli* Stämmen

Eine Einzelkolonie wurde von einer LB-Agarplatte mittels eines sterilen Zahnstochers in 10 ml LB-Flüssigmedium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums übertragen und über Nacht bei 180 rpm und 37 °C geschüttelt.

3.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen

Von einer Übernachtskultur wurden 1,5 ml Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl LB-Medium resuspendiert und mit 40 % Glycerin versetzt, gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Herstellung von kompetenten Zellen

Vom *E. coli* Stamm DH5α wurde eine Übernachtskultur angesetzt und bei 37 °C geschüttelt. Diese wurde am folgenden Morgen 1:100 in 500 ml LB-Flüssigmedium verdünnt und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit NaCl auf Eis inkubiert und danach für 8 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 ml eiskaltem 0,1 M MgCl₂ resuspendiert und für 8 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eiskaltem 0,1 M CaCl₂ gelöst, 30 min auf Eis inkubiert und 8 min bei 4 °C und 5500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml 0,1 M CaCl₂ und 2,5 ml 87 % Glycerol aufgenommen, zu 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Transformation durch Hitzeschock

Kompetente Zellen wurden für 15 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5-10 ng Plasmid dazugegeben und zusammen erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 sek bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C geschüttelt, auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.5 Plasmid- Minipräparation

Für die Plasmidpräparation wurden 2 ml einer Übernachtskultur verwendet und die Plasmide mit dem Plasmid Mini Kit der Firma Invitex nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmide wurden in A. bidest gelöst.

3.2.6 Plasmid- Maxi präparation

Zunächst wurde eine 3 ml Vorkultur angelegt, von dieser 2,5 ml 1:100 in LB-Flüssigmedium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums überführt und über Nacht bei 37 °C bei 180 rpm geschüttelt. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

5 µl 10 x Puffer B (15 mM MgCl₂)
1,5 µl vorwärts Primer (10 µM)
1,5 µl rückwärts Primer (10 µM)
1,5 µl dNTPs (10 mM)
10 ng cDNA/Plasmid
0,5 µl Opti-Taq Polymerase 5 U/µl
ad 50 µl A. dest

Das Programm des Thermocyclers wurde entsprechend der Fragmentgröße des erwarteten Amplifikats erstellt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass 1 kb/ 1 min geschrieben wurde. Die Anlagerungstemperatur T_a war dabei primerspezifisch.

Tabelle 10: Die verwendeten Einstellungen des Thermocyclers für die PCR.

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl der Zyklen |
|-------------------|----------------|------------|-------------------|
| Denaturierung | 95 °C | 3 min | 1 |
| Denaturierung | 95 °C | 1 min | } 25-35 |
| Primer Anlagerung | T _a | 1 min | |
| Verlängerung | 72 °C | 1 min/1 kb | |
| Endverlängerung | 72 °C | 5 min | 1 |
| Kühlschritt | 4 °C | ∞ | 1 |

Die PCR Produkte wurden in einem 1 % Agarosegel bei 90 V aufgetrennt.

3.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 % Agarosegel unter Zugabe von 0,75 µg/ml Ethidiumbromid bei 90 V in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Dabei wurden die Proben mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein 100 bp (Fermentas) oder 1 kb (Fermentas) Marker verwendet.

3.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mittels eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten und das Gewicht ermittelt. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des Gene Matrix Agarose Out DNA Purification Kit der Firma EURx nach Herstellerangaben.

3.2.10 Restriktionsverdau von DNA

Um die DNA an spezifischen Stellen zu schneiden, wurden 2 µg mit 1 U des entsprechenden Restriktionsenzym für 3 h bei 37 °C inkubiert und die entstandenen Fragmente anschließend zur Analyse auf einem Agarosegel aufgetrennt. Für einen Doppelverdau wurde der entsprechende optimale Puffer verwendet. Die eingesetzte Enzymmenge durfte dabei 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Konnte kein optimaler Puffer gefunden werden, wurde der Ansatz nach dem ersten Restriktionsverdau mit Ethanol gefällt.

2 µl 10 x Puffer
2 µl BSA
2 µg DNA/Plasmid
1 U Restriktionsenzym
ad 20 µl A. dest

3.2.11 DNA-Fällung mit Ethanol

Der zu fällende Ansatz wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 x Volumen 96 % Ethanol für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde im Folgenden zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, danach an der Luft getrocknet und in A. bidest eluiert.

3.2.12 RNA-Präparation

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen aus den entsprechenden Zellen nach Herstellerangaben. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.13 DNaseI Verdau

Der DNaseI Verdau erfolgte mit dem Kit der Firma Fermentas nach Herstellerangaben.

3.2.14 Microarrays

Von der isolierten RNA wurde die Konzentration bestimmt und die RNA auf Trockeneis zur Firma Miltenyi geschickt. Die Prozessierung der Microarrays sowie die Auswertung der Arrays erfolgte durch die Firma Miltenyi.

3.2.15 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Dabei gilt vereinfacht nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bei einer Absorption von 1 für dsDNA 50 µg/ml, ssDNA 37 µg/ml und für RNA 44 µg/ml.

Um die Reinheit der RNA zu bestimmen, wurde bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm die Absorption gemessen. Dabei sollte die Ratio zwischen 1,9 und 2,0 in 10 mM Tris HCl, pH 7,5 liegen.

3.2.16 cDNA Synthese

Nach der Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA wurden gleiche Mengen an RNA mittels reverser Transkriptase (M-MLV, Promega) in cDNA umgeschrieben:

1 µg cDNA
3 µl Oligo dT Primer
ad 14 µl A. dest DEPC

Das cDNA-Gemisch wurde für 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden folgende Komponenten zugefügt:

5 µl 5 x Reaktions Puffer
1,25 µl 10 mM dNTPs
1 µl M-MLV RT (H⁻)
1 µl RNasin
ad 25 µl A. dest DEPC

Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert und danach bei -20 °C gelagert:

Tabelle 11: Die Einstellungen des Thermocyclers für den ersten Schritt der cDNA-Synthese.

| Temperatur | Zeit |
|------------|--------|
| 42 °C | 1 h |
| 70 °C | 10 min |
| 4 °C | ∞ |

3.2.17 Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurden je Ansatz 15 ng cDNA verwendet:

2,2 µl nukleasefreies Wasser
0,5 µl vorwärmst Primer (10 µM)
0,5 µl rückwärts Primer (10 µM)
0,8 µl MgCl₂ (25 mM)
1 µl DNA Master Mix
5 µl cDNA

Der Master Mix enthielt als Farbstoff SYBR Green, der während der PCR in die DNA interkaliert. Dadurch steigt die Fluoreszenz mit jedem Zyklus an, was wiederum mit der Zunahme der DNA-Menge korreliert.

Tabelle 12: Die Einstellungen des Thermocyclers für den zweiten Schritt cDNA-Synthese.

| Schritt | Temperatur | Zeit | Anzahl der Zyklen |
|-------------------|----------------|--------|-------------------|
| Denaturierung | 95 °C | 10 min | 1 |
| Denaturierung | 95 °C | 10 sek | } 35 |
| Primer Anlagerung | T _a | 10 sek | |
| Verlängerung | 72 °C | 10 sek | |

T_a, die Anlagerungstemperatur, wurde dabei je nach Primer spezifisch gewählt und variiert daher bei den Experimenten abhängig davon, welcher Primer benutzt wurde. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung im Rotor Gene RG3000 von Corbett Research.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden die Zellen mit Triplelysispuffer (SDS-PAGE) oder Monolysispuffer (Native-PAGE) lysiert und anschließend zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde als Dreifachbestimmung gemessen. Die Messungen erfolgten mit dem D_C Protein Assay Kit der Firma Bio Rad nach Herstellerangaben in einer Mikrotiterplatte (96-well). Die Bestimmung erfolgte bei 750 nm. Als Standard für die Eichkurve diente BSA.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der Bestimmung der Proteinmenge wurden gleiche Mengen der Proben mit 1 x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 98 °C unter Schütteln denaturiert, auf ein denaturierendes Gel aufgetragen und unter Spannung laufen gelassen. Dabei wurden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Trenngel 10 %, 10 ml

2,5 ml 1,5 M Tris HCl, pH 8,8
3,33 ml 30 % PAA
100 µl 10 % SDS
50 µl 10 % APS
5 µl TEMED
ad 10 ml A. dest

Sammelgel 5 %, 3 ml

1,25 ml 0,5 M Tris HCl, pH 6,8
500 µl 30 % PAA
50 µl 10 % SDS
30 µl 10 % APS
3 µl TEMED
ad 3 ml A. dest

Die Proben liefen zunächst für 10 min bei 90 V ins Trenngel und wurden dann bei 130 V für etwa 80 min aufgetrennt und anschließend geblottet.

3.3.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte hier unter nativen Bedingungen. Dabei wurden gleiche Proteinmengen auf vorgefertigte 4-15 % PhastGel Gradientengele von GE Healthcare aufgetragen.

Das Programm setzte sich folgendermaßen zusammen:

| | | | | |
|--------|-------|--------|-------|-------|
| 10 Vh | 400 V | 10 mA | 2,5 W | 10 °C |
| 2 Vh | 400 V | 1 mA | 2,5 W | 10 °C |
| 150 Vh | 400 V | 10 mA | 2,5 W | 10 °C |
| 250 Vh | 10 V | 0,1 mA | 1 W | 10 °C |

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele geblottet.

3.3.4 Western Blot und Immundetektion

Die bei der SDS- bzw. Native-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels des Tank-Blot-Verfahrens im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dabei wurden das Gel und die Membran zwischen zwei Schwämmen und zwei Lagen Whatmanpapier in 1 x Blotpuffer bei 250 mA für 2 h auf Eis geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte anschließend mittels Ponceau-S-Färbung. Die Membran wurde danach für 1 h in 5 % Magermilchlösung (in PBS) unter Schütteln bei RT blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Membran für 2 h bei RT (bzw. über Nacht bei 4 °C) unter Schütteln mit dem Primärantikörper (in 5 % Magermilchlösung oder 1 % BSA gelöst in PBS). Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1 x PBST für jeweils 10 min gewaschen und dann für 1,5 h mit dem Sekundärantikörper (in 5 % Magermilchlösung gelöst in PBS) bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit 1 x PBST gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte nach Inkubation der Membran mit ECL-Lösung und anschließender Belichtung auf X-Omat Filmen der Firma Kodak.

3.3.5 Ponceau-S-Färbung

Die beim Western Blot auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine wurden mittels Ponceau-S-Färbung nachgewiesen. Dazu wurde die Membran 2 min in Ponceaulösung inkubiert und anschließend mehrmals mit A. dest gespült und entfärbt.

3.3.6 Glycerolgradientenzentrifugation

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wurden lineare Gradienten von 10- 40 % (v/v) Glycerol gegossen (je 6 ml Puffer A und B3). Die Gradienten wurden mit gleichen Mengen an Protein beladen und bei 27000 rpm für 22 h bei 4 °C im SW40 Rotor in einer Ultrazentrifuge der Firma Beckman zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten von unten nach oben geerntet, zu je 600 µl fraktioniert und anschließend mit TCA gefällt.

3.3.7 TCA-Fällung

Die Proteine wurden mit TCA mit einer Endkonzentration von 10 % gefällt. Dazu wurden die Proben mit TCA versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen

und das Pellet mit 500 µl 5 % TCA gewaschen, 5 min auf Eis inkubiert und erneut für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet, in 1 x Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 98 °C unter Schütteln denaturiert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung der Zellen

Die HeLa-Zellen wurden mit RPMI 1640 Medium bei 37 °C mit 5 % CO₂ unter Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Den siGFP bzw. siCSN1-Zellen wurde zum Medium zusätzlich 1 µg/ml Puromycin beigelegt. Das Aushungern der Zellen für die Versuche zur Zytokinstimulation erfolgte in RPMI 1640 Medium ohne FCS. Die murinen B8-Zellen wurden mit Isocove's MEM Medium bei 37 °C mit 5 % CO₂ unter Zugabe von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 125 µg/ml G418 und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Den stabil transfizierten B8-CSN2-Zellen wurde ferner 1 µg/ml Puromycin zugegeben.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA abgelöst und anschließend bei RT und 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 10 ml Medium aufgenommen. 20 µl wurden mit 1 Volumen 0,4 % Trypanblau vermischt und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Trypanblau kann nicht durch intakte Zellmembranen diffundieren. Nur tote Zellen, deren Membran zerstört ist, werden hierdurch angefärbt. So ist es möglich tote, blau angefärbte Zellen von lebenden zu unterscheiden.

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der ausgezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4/\text{ml}$$

(Volumen der Zählkammer).

3.4.3 Stimulation der Zellen mit Zytokinen

Die Zellen wurden für 30 min in serumfreiem Medium ausgehungert. Danach erfolgte die Zugabe von IFN α (10.000 U/ml) bzw. IFN γ (100 U/ml). Die Zellen wurden nach den entsprechenden, im Ergebnisteil angegebenen, Zeitpunkten geerntet.

3.4.4 Behandeln der Zellen mit Inhibitoren

Um die zytokinbedingte Induktion der CSN Neusynthese zu verhindern, wurden die Zellen zunächst für 30 min in serumfreiem Medium ausgehungert und anschließend mit je 50 μ M AG9 (TYK2-Inhibitor), AG490 (JAK2-Inhibitor) oder einer Mischung aus je 50 μ M AG9/AG490 für weitere 30 min behandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit IFN α bzw. IFN γ . Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert.

3.4.5 Transiente Transfektion

3.4.5.1 Transiente Transfektion von Vektoren

Zur Transfektion wurden am Vortag Zellen ausgezählt und ausgesät. Dabei wurde der Vektor mit Lipofectamine LTX (Invitrogen) unter Zugabe von Plus Reagenz in Opti-MEM Medium (Gibco) nach Herstellerangaben inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel (RPMI 1640), um das Lipofectamine aus dem Ansatz zu entfernen.

3.4.5.2 Transiente Transfektion von siRNA

Die Zellen wurden am Vortag ausgesät und mit der entsprechenden siRNA und Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben in Opti-MEM Medium transfiziert. Der Mediumwechsel erfolgte nach 6 h (RPMI 1640). Alle Reaktionsgefäße und Spitzen waren RNase- und DNase-frei.

3.4.5.3 Transiente Co-Transfektion von Vektoren und miRNA-Inhibitoren

Am Vortag wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und mit dem entsprechenden Vektor und den miRNA-Inhibitoren (20 μ M) unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in Opti-MEM Medium nach Herstellerprotokoll transfiziert. Dabei wurden die Vektoren und die miRNA-Inhibitoren zunächst getrennt inkubiert und erst bei der

Gabe auf die Zellen vereint. Das Medium wurde nach 6 h gewechselt (RPMI 1640). Alle Reaktionsgefäße und Spitzen waren RNase- und DNase-frei.

3.4.5.4 Transiente Co-Transfektion von Vektoren und miRNA-Mimics

Für die Transfektion wurden einen Tag zuvor 2×10^5 Zellen ausplattiert und mit dem His-CSN1-Überexpressionsvektor und den miRNA-Mimics (50 nM bzw. 100 nM) unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in Opti-MEM Medium transfiziert. Die Vektoren und die miRNA-Mimics wurden getrennt inkubiert. Erst bei der Zugabe auf die Zellen wurden der Vektor- und der Mimic-Ansatz gemischt und auf die Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Opti-MEM Medium entfernt und die Zellen für 48 h in RPMI 1640 Medium inkubiert. Alle Reaktionsgefäße und Spitzen waren RNase- und DNase-frei.

3.4.6 Zellyse

Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt und nach Zugabe von Lysepuffer (Mono- oder Triplelysispuffer) lysiert. Bei der Lyse durch Monolysispuffer (Native-PAGE) wurde das Lysat mehrfach durch eine Feindosierungsspritze (21-gauge Nadel) aufgesaugt, um die Lyseeffizienz zu erhöhen. Das Lysat wurde für 15 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Vom Zellysat wurde mittels des D_C Protein Assay Kits der Firma Bio Rad die Proteinkonzentration bestimmt. Gleiche Mengen des Proteinlysats wurden auf ein natives Gradienten Gel aufgetragen oder mit 1 x Ladepuffer versetzt, bei 98 °C für 5 min unter Schütteln aufgeköcht und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.5 Die statistische Auswertung

Die Daten dieser Arbeit stammen aus mindestens drei unterschiedlichen Experimenten. Aus den ermittelten Werten wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung bestimmt und dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse untereinander wurde für normalverteilte Daten mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt. Für Versuche mit mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen erfolgte ein One Way-ANOVA-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Als minimales Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Die Analyse der siCSN1-Zellen

4.1.1 Die Analyse der CSN-Untereinheiten und von c-Myc und STAT1 in siCSN1-Zellen auf Proteinebene

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um HeLa-Zellen, welche mit einem Vektor transfiziert wurden und infolgedessen stabil siRNA-Oligos gegen die CSN-Untereinheit CSN1 exprimieren (siCSN1-Zellen genannt) bzw. mit einem Kontrollvektor (siGFP-Zellen genannt) transfiziert wurden (Peth *et al.*, 2007¹). Diese Zellen wurden im Folgenden mittels Western Blot weiter charakterisiert.

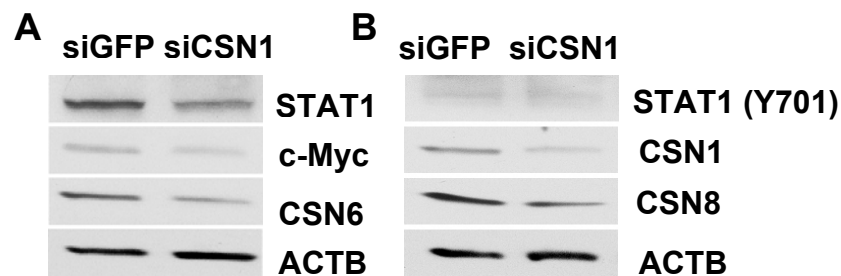


Abbildung 17: Nachweis der Proteinexpression in stabil transfizierten siCSN1- und siGFP-Zellen. Dargestellt ist die Proteinexpression von STAT1, c-Myc und CSN6 (A) sowie der phosphorylierten Form von STAT1 (Y701), CSN1 und CSN8 (B) in siCSN1-Zellen, verglichen mit den siGFP-Kontrollzellen. Als Ladekontrolle diente ACTB (β -Actin). Für die Detektion der Proteine im Western Blot wurden Antikörper gegen STAT1 (STAT1 α 91 kD; STAT1 β 84 kD), STAT1(Y701), (STAT1 α 91 kD, STAT1 β 84 kD), c-Myc (67 kD), CSN1 (53 kD), CSN6 (33 kD), CSN8 (23 kD) und ACTB (43 kD) verwendet.

In den siCSN1-Zellen waren die CSN-Untereinheiten CSN1, CSN8 (Abb. 17 B) und CSN6 (Abb. 17 A) auf Proteinebene im Vergleich zu den siGFP-Kontrollzellen reduziert. Des Weiteren waren die Transkriptionsfaktoren c-Myc und STAT1 (Abb. 17 A) sowie dessen phosphorylierte Form STAT1(Y701) (Abb. 17 B) herunterreguliert.

4.1.2 Die Analyse der CSN-Untereinheiten in siCSN1-Zellen auf mRNA-Ebene

Als nächstes wurde die mRNA-Expression der siCSN1-Zellen untersucht. Dazu wurde aus den stabil transfizierten siCSN1-Zellen sowie aus den Kontrollzellen (siGFP) die RNA isoliert.

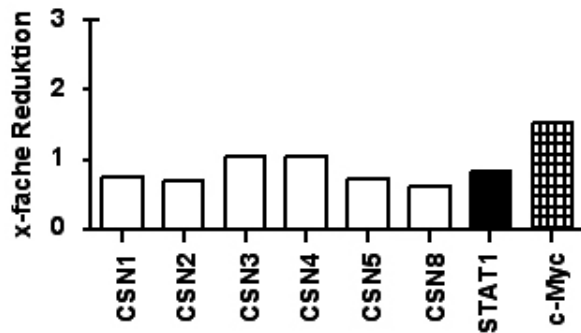


Abbildung 18: Die Auswertung des Microarrays. Dargestellt ist die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 und CSN8 und der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc. Es wurden hierfür die Werte der siGFP-Zellen mit den Werten der siCSN1-Zellen verrechnet. Diese sind als x-fache Expressionserhöhung angegeben.

Die Analyse der Microarray-Daten ergab, dass die mRNA-Expression verschiedener CSN-Untereinheiten auf mRNA-Ebene in den siCSN1-Zellen deutlich reduziert war. Die mRNA-Expression der Untereinheit CSN1 wurde um 24 %, von CSN2 um 31 %, die Expression von CSN5 um 27 % und CSN8 um 38 % reduziert. STAT1 wurde um 27 % im Vergleich mit den Kontrollzellen reduziert. Die c-Myc-Expression erhöhte sich im Gegensatz dazu in den siCSN1-Zellen um 53 %. Die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten CSN3 und CSN4 änderte sich im Vergleich zu den siGFP-Kontrollzellen nicht (Abb. 18).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden im Folgenden semiquantitative RT-PCRs zur Analyse der mRNA-Expression der CSN-Untereinheit CSN1 und ACTB durchgeführt.

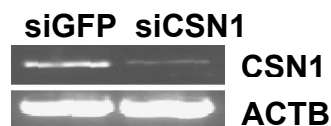


Abbildung 19: Die mRNA-Expression von CSN1 in siCSN1- und siGFP-Zellen. Semiquantitative RT-PCR mit Primern für die CSN-Untereinheit CSN1 und ACTB in siCSN1- und siGFP-Zellen. Dabei diente ACTB als Ladekontrolle. Die detektierten Banden lagen für CSN1 bei 956 bp und für ACTB bei 842 bp.

Die mRNA-Expression von CSN1 war in den siCSN1-Zellen im Vergleich zu den siGFP-Zellen deutlich herunterreguliert (Abb. 19). Die Expression von ACTB änderte sich im Gegensatz dazu nicht. Diese Ergebnisse wurden anschließend mittels Real-Time PCR quantifiziert.

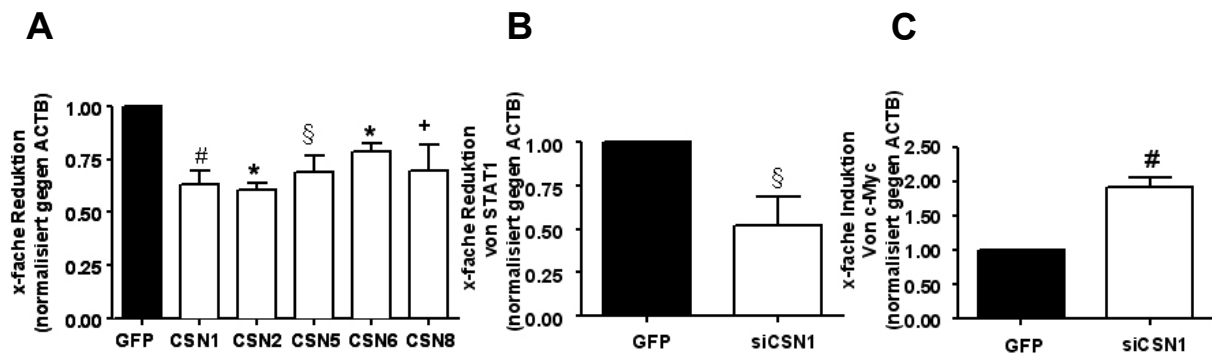


Abbildung 20: Darstellung der mRNA-Expression der Signalosomuntereinheiten CSN1, CSN2, CSN5, CSN6, CSN8 (A) und der Transkriptionsfaktoren STAT1 (B) sowie c-Myc (C) in siCSN1- und siGFP-Zellen (GFP) mittels Real-Time PCR. A) Die x-fache Reduktion der mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten in siCSN1-Zellen in Bezug auf die GFP-Kontrollzellen. Die Werte wurden gegen ACTB normalisiert. B) Die x-fache Reduktion der mRNA-Expression von STAT1 in den siCSN1-Zellen in Bezug auf die STAT1 mRNA-Expression in siGFP-Zellen. C) Die x-fache Induktion von c-Myc auf mRNA-Ebene in siCSN1-Zellen im Verhältnis zum c-Myc Level in den entsprechenden Kontrollzellen. (+) $p < 0,05$; (§) $p < 0,01$; (#) $p < 0,001$; (*) $p < 0,0001$.

In den siCSN1-Zellen wurde der gesamte CSN-Komplex auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Kontrollzellen herunterreguliert. Dabei zeigte die Untereinheit CSN1 eine Reduktion ihrer mRNA-Expression um 37 %, CSN2 um 39 %, die Untereinheit CSN5 um 36 %, CSN6 um 21 % und CSN8 um 31 % (Abb. 20 A). Diese Reduktion war begleitet von einem Rückgang der mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 um 48 % (Abb. 20 B). Die mRNA-Expression von c-Myc wurde im Gegensatz dazu um 91 % erhöht (Abb. 20 C).

4.2 Die Überexpression der Untereinheit CSN1 in siCSN1-Zellen

4.2.1 Die Analyse der Überexpression auf Proteinebene

In den siCSN1-Zellen war der CSN-Komplex im Vergleich zu den siGFP-Kontrollzellen sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 18; 19; 20 A-C), als auch auf Proteinebene (Abb. 17) stabil herunterreguliert. Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss der Überexpression von CSN1 mittels eines Überexpressionsvektors in den siCSN1-Zellen auf die Expression des CSN-Komplexes untersucht.

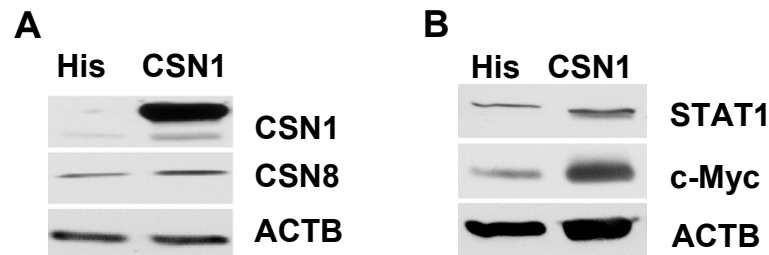


Abbildung 21: Die Darstellung der Proteinexpression von CSN1, CSN8, STAT1 und c-Myc in siCSN1-Zellen 48 h nach der Transfektion mit einem His-CSN1-Überexpressionsvektor (CSN1) bzw. einem His-Leervektor (His). Vergleichend dargestellt ist die Proteinexpression von CSN1 und CSN8 (A) sowie STAT1 und c-Myc (B) in siCSN1-Zellen, welche mit einem His-CSN1-Überexpressionsvektor bzw. dem His-Kontrollvektor transfiziert wurden. ACTB diente als Ladekontrolle. Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen CSN1, CSN8, STAT1, c-Myc und ACTB.

48 h nach der Transfektion des His-CSN1-Vektors in siCSN1-Zellen stieg die Proteinexpression von CSN1 und CSN8 in diesen Zellen an (Abb. 21 A). Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-Leervektor, welcher als Kontrolle diente, hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Die Expression der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc wurde durch die Überexpression von CSN1 in den siCSN1-Zellen ebenfalls erhöht (Abb. 21 B).

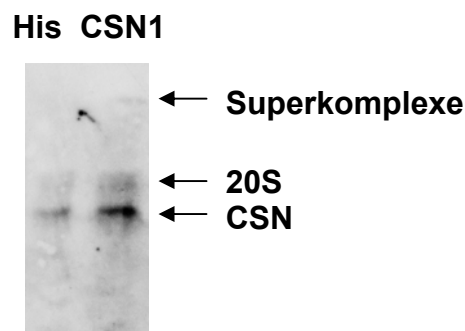


Abbildung 22: Die Charakterisierung der Proteinexpression in siCSN1-Zellen 48 h nach Überexpression des His-CSN1-Vektors (CSN1) bzw. des His-Kontrollvektors (His) mittels nativer Gelelektrophorese. Abgebildet ist die Expression des freien CSN-Komplexes (CSN), des CSN komplexiert mit dem 20S Proteasom (20S) sowie dem CSN integriert in die Superkomplexe (Superkomplexe). Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen CSN8.

Die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese zeigten, dass die Transfektion des His-CSN1-Vektors zu einer Induktion der Neusynthese des gesamten CSN-Komplexes in freier Form, komplexiert mit dem 20S Proteasom, wie auch integriert in

die Superkomplexe, führte. Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-Leervektor (His) besaß keinen Einfluss auf die CSN-Expression (Abb. 22).

4.2.2 Die Analyse der Expression der CSN-Untereinheiten nach CSN1-

Überexpression in siCSN1-Zellen auf mRNA-Ebene

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der CSN1-Überexpression auf die mRNA-Expression in siCSN1-Zellen untersucht. Als Kontrolle dienten siCSN1-Zellen, die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden.

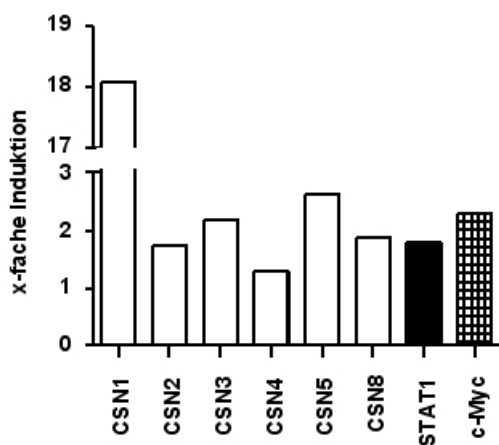


Abbildung 23: Die graphische Darstellung der Microarray-Daten. Abgebildet ist die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 und CSN8 sowie der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc in siCSN1-Zellen 48 h nach Transfektion mit His-CSN1-Vektor bzw. His-Leervektor in siCSN1-Zellen. Die Werte der Leervektorkontrolle wurden mit den Werten der His-CSN1 transfizierten siCSN1-Zellen verrechnet und als x-fache Expressionserhöhung dargestellt.

Die Überexpression von CSN1 in den siCSN1-Zellen führte zu einem Anstieg der mRNA-Expression der untersuchten CSN-Untereinheiten. Besonders CSN1 (18-fach), CSN3 (2,2-fach) und CSN5 (2,6-fach) wurden deutlich induziert. Die mRNA-Expression der CSN-Untereinheit CSN2 erhöhte sich 1,7-fach, CSN4 wurde 1,3-fach und CSN8 1,9-fach induziert. Die Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 wurde 1,8-fach erhöht und c-Myc 2,3-fach induziert (Abb. 23).

Tabelle 13: Die Darstellung der statistischen Auswertung der Microarray-Analyse relevanter Gene. Verglichen wurde die mRNA-Expression von siCSN1-Zellen und siGFP-Zellen (Spalte 1 und 2). Des Weiteren wurden siCSN1-Zellen mit His-CSN1-Vektor bzw. His-Leervektor transfiziert (24 h bzw. 48 h nach Transfektion) und analysiert (Spalten 4-6). Dargestellt sind ausgewählte, relevante Gene, wie die CSN-Untereinheiten, die Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc sowie Bestandteile des UPS. Die Werte zeigen die Log2-Ratios. Gene, deren Expression hochreguliert war, sind rot dargestellt. Eine grüne Farbmarkierung stellt herunterregulierte Gene dar.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------|----------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Gene# | Name | siCsn1.a | siCsn1.b | 24hCsn1.a | 24hCsn1.b | 48hCsn1.a | 48hCsn1.b |
| 3958 | CSN1: (CSN1 OR GPS | -0.40 | -1.00 | 3.44 | 0.58 | 4.59 | 4.18 |
| 7019 | CSN2: (CSN2 OR COF | -0.54 | -0.09 | 1.14 | -0.07 | 0.44 | 0.80 |
| 7022 | CSN3: (CSN3 OR COF | 0.07 | 0.48 | 1.92 | 0.33 | 0.45 | 1.12 |
| 7025 | CSN4: (CSN4 OR SGN | 0.06 | 0.32 | 0.99 | 0.04 | 0.21 | 0.39 |
| 7028 | CSN5: (COPS5 OR CS | -0.45 | -0.56 | 2.00 | 0.03 | 0.80 | 1.39 |
| 7031 | CSN6: (COPS6 OR CS | -0.25 | -0.64 | -1.47 | -0.47 | -0.18 | -1.09 |
| 7034 | CSN7A: (CSN7A OR C | 0.35 | 0.12 | 1.13 | 0.57 | 0.14 | 1.09 |
| 36526 | CSN7B: (COPS7B OR | | 0.03 | -1.06 | -2.25 | -0.27 | -0.30 |
| 7040 | CSN8: (CSN8 OR COF | -0.69 | -0.56 | 1.36 | 0.28 | 0.29 | 0.90 |
| 19853 | CSN12: (CSN12 OR FL | -0.27 | 0.06 | 1.38 | 0.32 | 0.44 | 0.59 |
| | | | | | | | |
| 4091 | STAT1: (STAT1) SIGN | -0.27 | -0.11 | 1.88 | 0.82 | 0.21 | 0.85 |
| 4191 | CMYC: (MYC) MYC PF | 0.40 | 0.61 | 1.95 | 0.66 | 0.25 | 1.21 |
| | | | | | | | |
| 19811 | CUL1: (CUL1) CULLIN | -0.32 | -0.09 | 1.63 | 0.42 | 0.32 | 0.76 |
| 36751 | CUL2: (CUL2) CULLIN | 0.29 | 0.43 | 0.41 | 0.14 | -0.01 | 0.29 |
| 19817 | CUL3: (CUL3 OR KIAA | 0.04 | 0.49 | 1.12 | 0.32 | 0.15 | 0.55 |
| 19820 | CUL4A: (CUL4A OR 2E | -0.25 | 0.03 | 1.87 | 0.38 | 0.31 | 0.87 |
| 19823 | CUL4B: (CUL4B OR KI | -0.20 | 0.03 | 1.12 | 0.28 | 0.21 | 0.35 |
| 6248 | CUL5: (CUL5 OR VACI | | -0.27 | -0.56 | -0.42 | -0.18 | -0.49 |
| 19862 | CUL7: (CUL7 OR KIAA | -0.11 | -0.15 | 0.94 | 0.15 | 0.21 | 0.42 |
| 19781 | ANAPC2: (ANAPC2 OI | -0.32 | -0.14 | -0.97 | -1.03 | -0.15 | -0.56 |
| | | | | | | | |
| 7849 | NEDD8: (NEDD8) UBIC | 0.51 | -0.09 | 2.25 | 0.68 | 0.35 | 2.29 |
| 29862 | UBE1C: (UBE1C OR U | 0.06 | 0.10 | 0.53 | 0.03 | 0.03 | 0.18 |
| 29763 | APPBP1: (APPBP1 OI | -0.15 | 0.11 | 0.91 | 0.21 | 0.24 | 0.35 |
| 18442 | UBE2M: (UBE2M OR U | 0.58 | -0.15 | -0.86 | -0.11 | -0.04 | 0.06 |
| 18451 | NCE2: (NCE2) NEDD8 | -0.64 | -0.52 | 0.26 | 0.04 | 0.01 | 0.11 |
| 19625 | RBX1: (RBX1 OR RNF7 | -0.04 | -0.30 | 1.64 | 0.01 | 0.51 | 1.03 |
| 19628 | RNF7: (RNF7 OR RBX | 0.06 | 0.12 | 1.65 | 0.06 | 0.19 | 0.62 |
| 32298 | DCUN1D4: (DCUN1D4) | 0.20 | 0.28 | 0.90 | 0.42 | 0.41 | 0.54 |
| 18520 | SENPA8: (SENPA8 OR F | | -0.30 | -0.86 | -0.79 | -0.15 | -0.49 |
| 18952 | NUB1: (NUB1 OR BS4 | | | -0.60 | 0.45 | -0.04 | -0.34 |
| 36517 | CAND1: (CAND1 OR K | 0.08 | 0.20 | 1.29 | 0.37 | 0.21 | 0.35 |

Die Tabelle 13 mit der statistischen Auswertung der Microarrays zeigt eine Auswahl an relevanten Genen des UPS, die durch die Transfektion mit dem His-CSN1-Vektor beeinflusst wurden. In den siCSN1-Zellen war die Mehrzahl der CSN-Untereinheiten auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den siGFP-Kontrollzellen herunterreguliert. Dabei waren die Untereinheiten CSN1, CSN5 und CSN6 besonders stark in ihrer mRNA-Expression reduziert. Des Weiteren war die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors STAT1 sowie einiger Culline, wie z. B. Cullin1, in diesen Zellen deutlich verringert (Tab. 13, Spalte 1 & 2). Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1-Überexpressionsvektor führte bereits nach 24 h zu einer deutlichen Induktion der CSN1 mRNA-Expression (Tab. 13, Spalte 3 & 4). Die CSN1-Überexpression

führte in den siCSN1-Zellen ferner zu einer Erhöhung der Expression der CSN-Untereinheiten CSN2, CSN3, CSN4, CSN5, CSN7 und CSN8 auf mRNA-Ebene. Auch die Expression von Nedd8, verschiedener Culline, wie z. B. Cullin1 und Cullin4A, sowie der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc wurde deutlich induziert. 48 h nach Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1-Vektor konnte ebenfalls eine Expressionserhöhung der CSN-Untereinheiten CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5, CSN7A und CSN8 detektiert werden. Des Weiteren war die Expression Nedd8, Rbx1, STAT, c-Myc, Cullin1 und Cullin4A deutlich erhöht (Tab. 13, Spalte 5 & 6). Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden semiquantitative RT-PCRs durchgeführt.

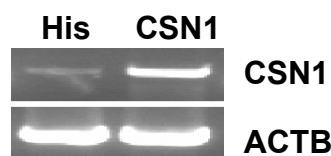


Abbildung 24: Analyse der mRNA-Expression von CSN1 in siCSN1-Zellen 24 h nach Transfektion von His-CSN1- berexpressionsvektor (CSN1) bzw. His-Leervektor (His) mittels semiquantitativer RT-PCR. Verwendet wurden Primer für die CSN-Untereinheit CSN1 (956 bp) und für ACTB (842 bp).

Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit His-CSN1-Vektor führte zu einer deutlichen Induktion der mRNA-Expression von CSN1 im Vergleich zu den Zellen, die mit dem His-Leervektor transfiziert wurden (Abb. 24), wie es auch in den Analysen der Microarrays zu beobachten war. Zur Quantifizierung dieser Daten wurden Real-Time PCRs durchgeführt.

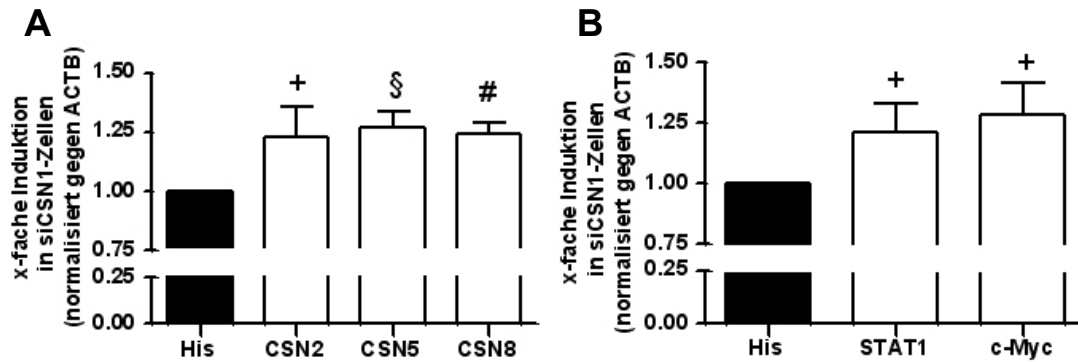


Abbildung 25: Darstellung der mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten (A), STAT1 und c-Myc (B) in siCSN1-Zellen mittels Real-Time PCR. Vergleichend dargestellt ist die x-fache Induktion der mRNA der CSN-Untereinheiten CSN2, CSN5 und CSN8 sowie von STAT1 und c-Myc nach der Transfektion von His-Leervektor (His) oder His-CSN1-Vektor. Dabei wurde für die entsprechende Untereinheit die Expression der mit His-CSN1-Vektor transfizierten Zellen mit der Expression der mit His-Leervektor transfizierten Zellen verrechnet. Die Werte wurden gegen ACTB normalisiert. A) Die x-fache Induktion der mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten CSN2, CSN5 und CSN8 im Verhältnis zu den ermittelten Werten nach der Transfektion mit dem Leervektor. B) Die x-fache Induktion von STAT1 und c-Myc auf mRNA-Ebene nach Transfektion von His-Leervektor bzw. His-CSN1-Vektor. (+) $p < 0,05$; (§) $p < 0,01$; (#) $p < 0,001$; (*) $p < 0,0001$.

24 h nach der Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1-Überexpressionsvektor bzw. dem Kontrollvektor wurde die mRNA-Expression mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten CSN2 stieg um 22 %, die Expression von CSN5 um 27 % und von CSN8 um 24 % an (Abb. 25 A). Die Expression der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc wurde um 21 % bzw. 28% induziert. Ferner führte die Transfektion der siCSN1-Zellen mit His-CSN1 zu einer Induktion der Expression der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc (Abb. 25 B).

4.2.3 Der Einfluss der Regulation des CSN-Komplexes auf die mRNA-Expression des proteasomalen Lids

Das CSN kann als alternativer Lid fungieren (Li *et al.*, 2003). Daher wurde im Folgenden der Einfluss der Regulation des COP9 Signalosoms auf die mRNA-Expression des proteasomalen Lids mittels Microarray-Analysen untersucht.

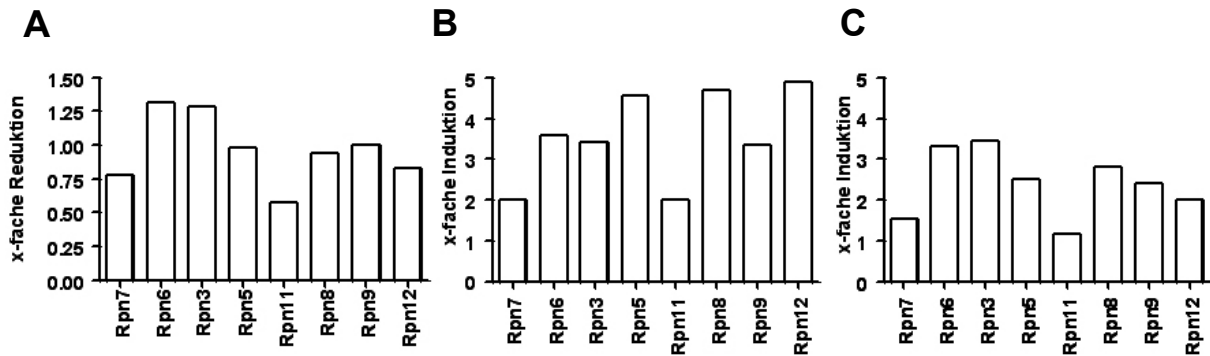


Abbildung 26: Die Ergebnisse der Microarray-Analyse. Abgebildet ist die mRNA-Expression der proteasomalen Lid-Untereinheiten in siCSN1-Zellen. A) Die mRNA-Expression in siCSN1-Zellen im Verhältnis zu siGFP-Zellen. B) Die Expression in siCSN1 Zellen 24 h nach der Überexpression von His-CSN1, verglichen mit Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden. C) Die Expression in siCSN1-Zellen nach 48 h Überexpression von CSN1. Es wurde die Expression verschiedener relevanter Gene in His-CSN1 transfizierten Zellen mit der Expression in Zellen verglichen, die mit einem His-Leervektor transfiziert wurden. Hierbei entspricht Rpn7 CSN1, Rpn6 CSN2, Rpn3 CSN3, Rpn5 CSN5, Rpn11 CSN5, Rpn8 CSN6, Rpn9 CSN7 und Rpn12 CSN8. Die dargestellten Werte sind als x-fache Expressionserhöhung angegeben.

In den stabil transfizierten siCSN1-Zellen wurde der CSN-Komplex herunterreguliert. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression der proteasomalen Lid-Untereinheiten Rpn7 (entspricht CSN1) um 22 %, Rpn11 (entspricht CSN5) um 42 % und Rpn12 (entspricht CSN8) um 17 % in siCSN1-Zellen im Vergleich zu siGFP-Zellen reduziert (Abb. 26 A). Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem CSN1-Überexpressionsvektor führte nach 24 h zu einer deutlichen Induktion aller Lid-Untereinheiten auf Ebene der mRNA-Expression. Besonders Rpn5 (entspricht CSN4), Rpn8 (homolog zu CSN6) und Rpn12 (entspricht CSN8) waren über 4,5-fach erhöht im Vergleich zu siCSN1-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden (Abb. 26 B). 48 h nach Transfektion schwächte sich dieser induktive Effekt im Hinblick auf die Expression der Lid-Untereinheiten weiter ab (Abb. 26 C).

4.3 Die Analyse der CSN-Expression nach CSN2-Überexpression

4.3.1 Die Charakterisierung der mRNA-Expression in HeLa-Zellen nach transienter CSN2-Überexpression

Naumann und Kollegen zeigten im Jahre 1999, dass die Überexpression von CSN2 in HeLa-Zellen zu einer Induktion der *de novo* Synthese des CSN-Komplexes auf Proteinebene führte. Daher untersuchte ich im nächsten Schritt, welchen Einfluss die Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Flag-CSN2-Überexpressionsvektor auf die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten besaß.

Tabelle 14: Die Charakterisierung der mRNA-Expression mittels Microarray-Analysen nach Transfektion von Flag-CSN2 bzw. Flag-Leervektor in HeLa-Zellen. Die Tabelle zeigt die statistische Auswertung der Microarray-Daten. Dabei wurde die mRNA-Expression in HeLa-Zellen nach der Transfektion der Zellen mit dem von Flag-CSN2-Vektor mit der Expression nach der Transfektion des Flag-Kontrollvektors nach 14 h (Spalte 2), 18 h (Spalte 3) bzw. 24 h (Spalte 4) verglichen. Spalte 1 zeigt die mRNA-Expression nach der Transfektion des Flagkontrollvektors, verglichen mit unbehandelten Wildtypzellen. Untersucht wurde die Expression interessanter Gene, darunter die CSN-Untereinheiten, die Transkriptionsfaktoren STAT1, c-Myc und Bestandteile des UPS. Die Ergebnisse sind als Log2-Ratios angegeben. Die rote Farbmarkierung stellt eine Hochregulation der Genexpression dar, während eine grüne Markierung eine Herunterregulation kennzeichnet.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| Gene# | Name | Flag_WT | 14hCsn2 | 18hCsn2 | 24hCsn2 |
| 3958 | CSN1: (CSN1 OR GPS | -0.25 | 0.11 | 0.26 | 0.70 |
| 7019 | CSN2: (CSN2 OR COF | -0.43 | 1.02 | 1.33 | 0.92 |
| 7022 | CSN3: (CSN3 OR COF | -0.62 | 0.12 | 0.18 | 0.23 |
| 7025 | CSN4: (CSN4 OR SGN | -0.43 | -0.25 | -0.04 | -0.09 |
| 7028 | CSN5: (COPS5 OR CS | -0.04 | -0.01 | -0.34 | -0.43 |
| 7031 | CSN6: (COPS6 OR CS | -0.03 | -0.49 | -0.18 | -0.03 |
| 7034 | CSN7A: (CSN7A OR C | -0.42 | 1.13 | 0.14 | 0.69 |
| 36526 | CSN7B: (COPS7B OR | | | 0.12 | -0.03 |
| 7040 | CSN8: (CSN8 OR COF | -0.40 | 1.12 | 0.41 | 1.02 |
| 19853 | CSN12: (CSN12 OR FI | -0.45 | -0.43 | -0.11 | 0.04 |
| 4091 | STAT1: (STAT1) SIGN | -0.74 | 1.38 | 0.30 | 1.05 |
| 4191 | CMYC: (MYC) MYC PI | -0.30 | 0.50 | 0.06 | 0.39 |
| 19811 | CUL1: (CUL1) CULLIN | -0.11 | 0.16 | 0.01 | -0.07 |
| 36751 | CUL2: (CUL2) CULLIN | 0.21 | 0.07 | 0.33 | 0.42 |
| 19817 | CUL3: (CUL3 OR KIAA | -0.34 | 0.31 | 0.33 | 0.56 |
| 19820 | CUL4A: (CUL4A OR 2E | -0.14 | 0.16 | 0.01 | 0.00 |
| 19823 | CUL4B: (CUL4B OR KI | 0.01 | -0.11 | 0.01 | -0.06 |
| 6248 | CUL5: (CUL5 OR VACI | | | | |
| 19862 | CUL7: (CUL7 OR KIAA | -0.27 | 0.25 | -0.36 | 0.00 |
| 19781 | ANAPC2: (ANAPC2 OI | 1.47 | -1.12 | -0.11 | -0.15 |
| 7849 | NEDD8: (NEDD8) UBIQ | -0.34 | 1.31 | 0.60 | 0.93 |
| 29862 | UBE1C: (UBE1C OR U | -0.15 | -0.52 | -0.17 | 0.01 |
| 29763 | APPBP1: (APPBP1 OI | -0.22 | 0.29 | -0.11 | -0.01 |
| 18442 | UBE2M: (UBE2M OR I | 0.54 | 0.26 | 0.41 | 0.54 |
| 18451 | NCE2: (NCE2) NEDD8 | 0.00 | 0.64 | -0.03 | -0.12 |
| 19625 | RBX1: (RBX1 OR RNF7 | -0.23 | 0.18 | -0.07 | -0.09 |
| 19628 | RNF7: (RNF7 OR RBX | -0.04 | 0.19 | -0.23 | -0.43 |
| 32298 | DCUN1D4: (DCUN1D4 | -0.64 | 0.63 | 0.03 | 0.21 |
| 18520 | SENPA8: (SENPA8 OR F | | | 0.06 | -0.27 |
| 18952 | NUB1: (NUB1 OR BS4 | 0.98 | -0.06 | 0.03 | -0.18 |
| 36517 | CAND1: (CAND1 OR K | -0.01 | | -0.25 | -0.29 |

Die mRNA-Expression wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (14 h, 18 h und 24 h nach Transfektion) bestimmt. Die Analyse der Microarrays zeigte, dass 14 h, 18 h sowie 24 h nach der Transfektion der HeLa-Zellen mit dem CSN2-Vektor die mRNA-Expression von CSN2 deutlich erhöht wurde. Die Überexpression von Flag-CSN2 in HeLa-Zellen besaß ebenfalls einen induktiven Effekt auf die Expression von CSN7A und CSN8. Die Expression der Untereinheiten CSN1 und CSN3 wurde durch die Transfektion von Flag-CSN2 auf mRNA-Ebene nur leicht induziert. Des Weiteren konnte eine Expressionserhöhung von STAT1, Nedd8 sowie verschiedener Culline beobachtet werden. Besonders Cullin2 und Cullin3 wurden auf Ebene der mRNA-Expression deutlich induziert (Tab. 14, Spalte 2-4). Die Transfektion des Flag-Leervektors hatte keinen induktiven Einfluss auf die mRNA-Expression der untersuchten Gene (Tab. 14, Spalte 1).

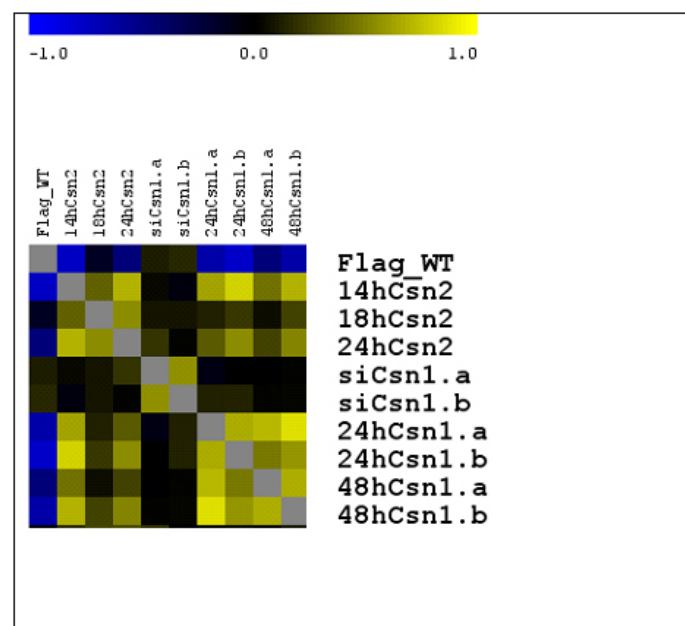


Abbildung 27: Die Darstellung der Ergebnisse eines globalen interexperimentellen Vergleiches der PIQOR™-UPS Microarrays. Dargestellt sind die Experimente zur Überexpression von Flag-Leervektor in HeLa-Zellen, verglichen mit unbehandelten Wildtypzellen. Des Weiteren wurde die Überexpression von Flag-CSN2-Vektor mit Flag-Leervektor in HeLa-Zellen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (14 h, 18 h und 24 h) verglichen. Zuletzt wurde die Überexpression von CSN1 mittels des Überexpressionsplasmids mit den entsprechenden Kontrollen 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion analysiert. Die gelben Kästchen deuten auf eine positive Korrelation hin, wohingegen die blauen Kästchen eine negative Korrelation anzeigen.

In der Abbildung sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Daten aus den durchgeführten Experimenten zueinander dargestellt. Dabei deutet eine z. B. starke Gelbfärbung auf eine höhere Korrelation hin. Eine schwächere Intensität der

jeweiligen Farbe zeigt eine geringere Korrelation der entsprechenden Experimente an.

Die Korrelationsanalyse der durchgeführten Microarray-Experimente zeigte, dass die Experimente, bei denen entweder die Signalosomuntereinheiten CSN1 oder CSN2 überexprimiert wurden, gelb gekennzeichnet sind, also miteinander korrelieren (Abb. 27). Die Versuche, bei denen siCSN1-Zellen mit siGFP-Kontrollzellen verglichen wurden, korrelieren ebenfalls untereinander (gelb dargestellt). Die Analyse ergab ferner, dass die Ergebnisse dieser Versuche jedoch wenig mit den Überexpressionsstudien korrelierten (Abb. 27).

4.3.2 Die Charakterisierung der mRNA-Expression in murinen B8-Fibroblasten nach stabiler CSN2-Überexpression

Huang *et al.* zeigten im Jahre 2005, dass die stabile Überexpression der CSN-Untereinheit CSN2 in murinen B8-Fibroblasten zu einer *de novo* Synthese des gesamten CSN-Komplexes führt. Mittels Microarray-Analysen sollte im Folgenden der Einfluss der stabilen Überexpression von CSN2 auf die mRNA-Expression des CSN-Komplexes charakterisiert werden.

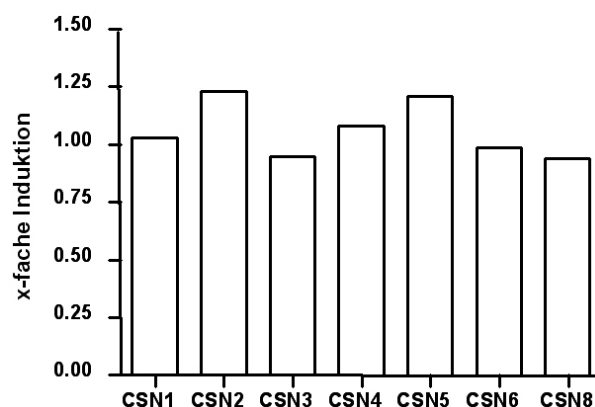


Abbildung 28: Die graphische Darstellung der Microarray-Daten. Abgebildet ist die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5, CSN6 und CSN8 in stabil mit Flag-CSN2 transfizierten murinen B8-Fibroblasten. Die Werte der Leervektorkontrolle (B8-Flag-Zellen) wurden mit den Werten der Flag-CSN2 transfizierten B8-Fibroblasten (B8-CSN2-Zellen) verrechnet und als x-fache Expressionserhöhung dargestellt.

Die stabile Überexpression der CSN-Untereinheit CSN2 in murinen B8-Fibroblasten führte auf mRNA-Ebene zu keiner deutlichen Erhöhung der Expression der CSN-Untereinheiten. Die Untereinheiten CSN1, CSN3, CSN4, CSN6 und CSN8 zeigten

keine Veränderung in ihrer mRNA-Expression. Eine geringe Induktion der mRNA-Expression konnte bei den CSN2 und CSN5 detektiert werden (Abb. 28).

4.4 Der Einfluss von Zytokinstimulation auf die CSN-Expression

In den stabil herunterregulierten siCSN1-Zellen, und auch in den transient mit His-CSN1-Vektor transfizierten siCSN1-Zellen konnte eine Regulation von STAT1 sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene gezeigt werden. Im Folgenden wurde STAT1 durch die Stimulation der Zellen mit den Zytokinen IFN α bzw. IFN γ induziert und der Effekt auf das CSN untersucht.

4.4.1 Der Effekt von IFN α auf die CSN-Expression

HeLa- bzw. siCSN1-Zellen wurden mit IFN α stimuliert und der Einfluss dieses Zytokins auf die Proteinexpression des CSN mittels Western Blot-Analyse charakterisiert.

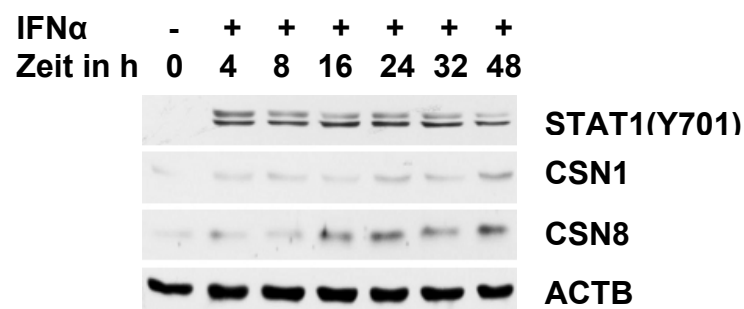


Abbildung 29: Der Einfluss der IFN α -Stimulation auf die Proteinexpression in siCSN1-Zellen. Die Expression von CSN1, CSN8 sowie der Phosphorylierungszustand von STAT1 (STAT1(Y701)) wurde 0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h und 48 h nach der Stimulation mit IFN α (10.000 U/ml) analysiert. ACTB diente als Ladekontrolle. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern gegen STAT1(Y701), CSN1, CSN8 und ACTB.

Die Inkubation der siCSN1-Zellen mit IFN α führte bereits nach 4 h zu einer deutlichen Erhöhung der STAT1-Phosphorylierung (Abb. 29). Diese Induktion der STAT1-Phosphorylierung blieb über einen Zeitraum von 48 h Stunden erhalten und verringerte sich über diesen Zeitraum leicht. Ferner führte die IFN α -Stimulation nach 16 h zu einer Expressionserhöhung der CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN8. Der induktive Effekt war bei der CSN-Untereinheit CSN8 besonders deutlich (Abb. 29).

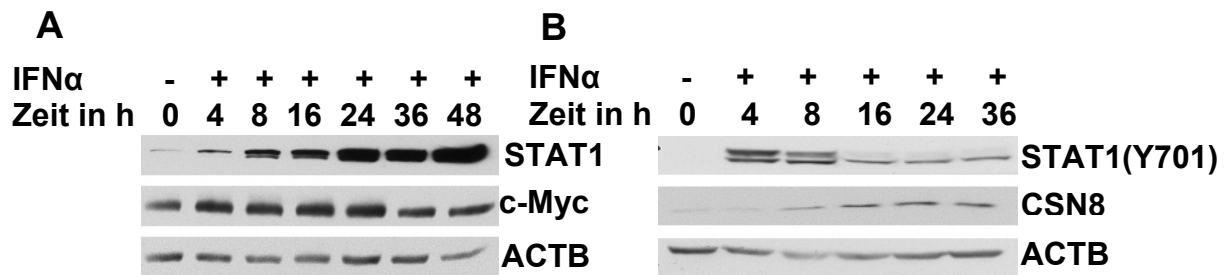


Abbildung 30: Die Proteinexpression von STAT1, c-Myc und CSN8 nach IFN α -Stimulation in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 36 h und 48 h nach der Stimulation mit IFN α (10.000 U/ml) mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde die Proteinexpression von STAT1, c-Myc (A) und CSN8 sowie die Beeinflussung der STAT1-Phosphorylierung (B) untersucht. ACTB diente als Ladekontrolle. Für den Western Blot wurden Antikörper gegen STAT1, STAT1(Y701), c-Myc, CSN8 und ACTB verwendet.

Die Behandlung der HeLa-Zellen mit dem Zytokin IFN α führte ebenfalls nach 4 h zu einem deutlichen Anstieg der phosphorylierten Form von STAT1(Y701) (Abb. 30 B). Diese Induktion der STAT1-Phosphorylierung verringerte sich nach 16 h wieder und blieb dann stabil. Die Proteinexpression von STAT1 wurde durch die IFN α -Stimulation induziert und stieg über den gesamten Zeitraum von 48 h stetig an (Abb. 30 A). Des Weiteren war ein deutlicher Anstieg der Proteinexpression von c-Myc bis 24 h nach Stimulation (Abb. 30 A) und der CSN-Untereinheit CSN8 (Abb. 30 B) zu erkennen. Die Expression von CSN8 wurde 16 h nach der IFN α -Stimulation induziert und steigerte sich über die gesamte beobachtete Zeitspanne bis 36 h nach der Stimulation. Die ermittelten Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten aus Abbildung 29. Sowohl HeLa- als auch siCSN1-Zellen (Abb. 29) wiesen nach Stimulation mit IFN α eine deutliche Induktion der Expression von CSN8 auf.

4.4.2 Der Effekt von IFN γ auf die CSN-Expression

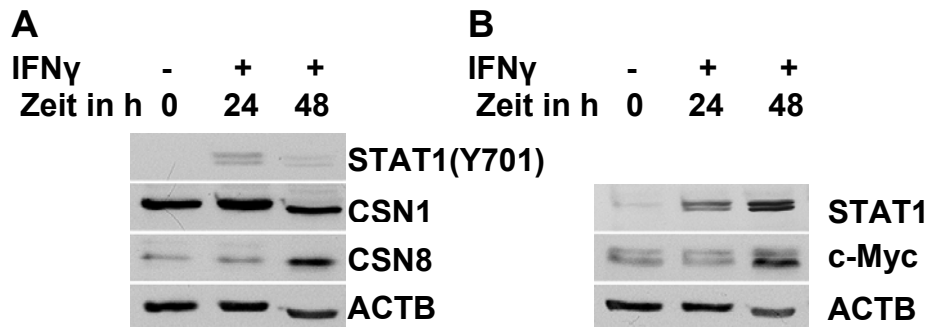


Abbildung 31: Die Proteinexpression von CSN1, CSN8, der Phosphorylierung von STAT1 (A), STAT1 und c-Myc (B) in IFN γ stimulierten HeLa-Zellen. Die Inkubation der Zellen mit IFN γ (100 U/ml). Die Detektion erfolgte durch Western Blot-Verfahren mittels der Antikörper gegen STAT1, STAT1(Y701), CSN1, CSN8, c-Myc und ACTB. 0 h, 24 h und 48 h nach der Stimulation der Zellen. ACTB diente als Ladekontrolle.

Wie bereits bei der Stimulation der siCSN1-Zellen mit IFN α (Abb. 29) und der HeLa-Zellen mit IFN α (Abb. 30 A & B) führte die Stimulation der HeLa-Zellen mit IFN γ zu einer Erhöhung der phosphorylierten Form von STAT1(Y701) (Abb. 31 A). Die Proteinexpression von STAT1 wurde ebenfalls durch die Stimulation der HeLa-Zellen induziert (Abb. 31 B). Des Weiteren führte die Behandlung der Zellen mit dem Zytokin zu einer Erhöhung der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN8 (Abb. 31 A) sowie des Transkriptionsfaktors c-Myc (Abb. 31 B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Behandlung der Zellen mit IFN α , als auch mit IFN γ zur Induktion der Proteinexpression des CSN führte.

4.5 Die Inhibition von JAK2 und TYK2 durch die Inhibitoren AG9 und AG490

JAK- bzw. TYK-Kinasen werden durch die Bindung von Zytokinen aktiviert. Dieses führt zu einer Phosphorylierung und einer daraus resultierenden Aktivierung von STAT1. Im aktivierten Zustand transloziert das dimerisierte STAT1 in den Nukleus und induziert dort die Transkription seiner Zielgene.

Durch die Zugabe spezifischer Hemmstoffe wie AG9 (TYK2-Inhibitor) und AG490 (JAK2-Inhibitor) wurde der JAK-STAT-Signalweg unterbrochen. Der Einfluss dieser Inhibition auf die Transkription verschiedener Zielgene wurde nachfolgend auf Proteinebene untersucht.

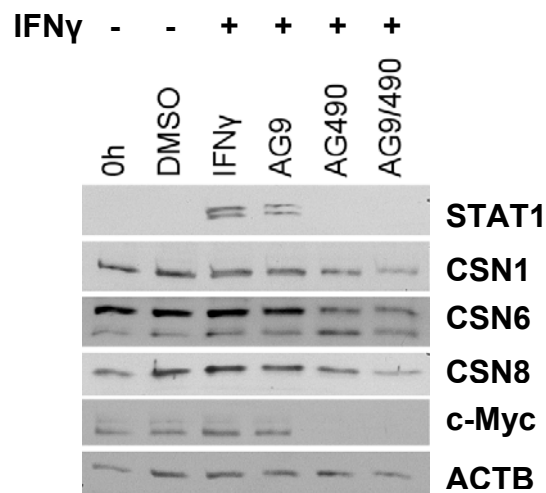


Abbildung 32: Die Inhibition der TYK2- und JAK1-Kinase durch AG9 und der JAK1- und JAK2-Kinase durch AG490 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert und anschließend für 24 h mit IFN γ (100 U/ml) stimuliert. Die Inhibitoren AG9 (50 μ M) und AG490 (50 μ M) waren in DMSO gelöst. Abgebildet ist die Proteinexpression von STAT1, CSN1, CSN6, CSN8 und c-Myc. ACTB diente als Ladekontrolle. Für die Western Blot-Analyse wurden Antikörper gegen STAT1, CSN1, CSN6, CSN8, c-Myc und ACTB verwendet.

Die Stimulation der HeLa-Zellen mit IFN γ führte zu einer Induktion der Proteinexpression von STAT1 und c-Myc. Die Expression der CSN-Untereinheiten wurde durch die Zytokinstimulation ebenfalls deutlich erhöht (Abb. 29-31). Die Inhibition der Kinasen JAK1 und TYK mit Hilfe des Inhibitors AG9 induzierte eine Reduktion der Proteinexpression von STAT1 und c-Myc (Abb. 32). Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor AG490 resultierte ebenfalls in einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression von STAT1 und c-Myc. Der Inhibitor bewirkte ebenfalls eine verminderte Expression der untersuchten Untereinheiten CSN1, CSN6 und CSN8. Der Einsatz beider Inhibitoren in Kombination verstärkte diesen Effekt. Dabei war zu beobachten, dass dieser reduktive Effekt besonders die CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN8 betraf. Auch die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc war deutlich herabgesetzt (Abb. 32).

4.6 Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von STAT1 auf die CSN-Expression

Um die vorhergehenden Ergebnisse zu bestätigen, wurden sowohl HeLa- als auch siCSN1-Zellen mit Vektoren transfiziert, die eine siRNA gegen STAT1 (siSTAT1)

exprimierten bzw. dem entsprechenden Kontrollvektor (CTL) und anschließend mit den Zytokinen IFN α bzw. IFN γ stimuliert.

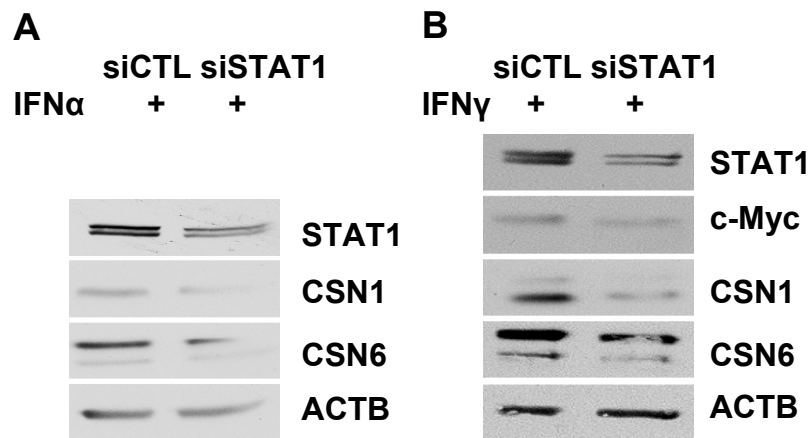


Abbildung 33: Die Proteinexpression in HeLa-Zellen nach der Transfektion mit dem siSTAT1-Vektor (siSTAT1) bzw. dem si-Kontrollvektor (CTL) sowie der Stimulation der Zellen mit IFN α (10.000 U/ml) (A) oder IFN γ (100 U/ml) (B). Analysiert wurde die Proteinexpression von STAT1, CSN1 und CSN6 nach Transfektion mit siSTAT1 bzw. siCTL und anschließender Stimulation der Zellen mit IFN α für 24 h (A). Des Weiteren wurde die Proteinexpression von STAT1, c-Myc, CSN1 und CSN6 nach Transfektion von siSTAT1 bzw. siCTL und anschließender Stimulation mit IFN γ für 24 h (B) untersucht. ACTB diente als Ladekontrolle. Für die Western Blot-Analyse wurden Antikörper gegen STAT1, CSN1, CSN6, c-Myc und ACTB verwendet.

Die Transfektion der HeLa-Zellen mit dem siSTAT1-Vektor führte im Vergleich zu den Zellen die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden zu einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression von STAT1, sowohl nach der Stimulation mit IFN α als auch mit IFN γ (Abb. 33 A & B). Des Weiteren wurde die zytokininduzierte Neusynthese der Signalosomuntereinheiten durch Transfektion der Zellen mit dem siSTAT1-Vektor verringert (Abb. 33 A & B). Die Stimulation der HeLa-Zellen, die mit dem siSTAT1-Vektor transfiziert wurden, mit IFN α bzw. IFN γ führte zu einer drastischen Reduktion der Proteinexpression von CSN1 und CSN6 (Abb. 33 A & B). Die Expression von c-Myc war in den siSTAT1 transfizierten Zellen nach IFN γ Stimulation ebenfalls deutlich reduziert (Abb. 33 B).

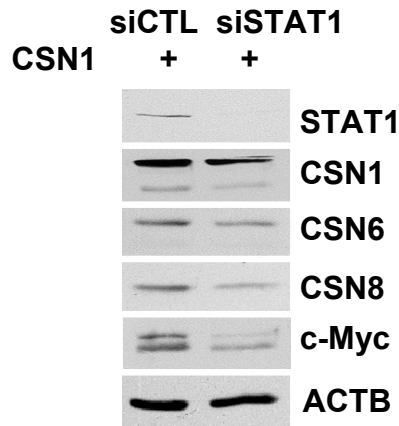


Abbildung 34: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen nach der Co-Transfektion mit His-CSN1-Überexpressionsvektor und dem siSTAT1-Vektor bzw. siCTL (Kontrollvektor). Untersucht wurde die Proteinexpression von STAT1, CSN1, CSN6, CSN8 und c-Myc nach Co-Transfektion mit His-CSN1-Vektor und siSTAT1 bzw. siCTL. ACTB diente als Ladekontrolle. Für den Western Blot wurden Antikörper gegen STAT1, CSN1, CSN6, CSN8, c-Myc und ACTB verwendet.

Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1-Überexpressionsvektor führte zu einer Induktion der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten (Abb.21). Die Zellen, die mit siSTAT1-Vektor und His-CSN1-Vektor co-transfiziert wurden, wiesen eine deutlich geringere Proteinexpression der Signalosomuntereinheiten CSN1, CSN6 und CSN8 im Vergleich zu den Zellen auf, die mit His-CSN1 und dem Kontrollvektor siCTL co-transfiziert wurden (Abb. 34). Die Transfektion der Zellen mit dem siSTAT1-Vektor sowie dem His-CSN1-Vektor führte zu einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression von c-Myc und STAT1 (Abb. 34).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die siRNA-vermittelte Inhibition von STAT1 einen reduktiven Effekt sowohl auf die Proteinexpression von c-Myc als auch auf die Expression der untersuchten Untereinheiten des CSN besaß.

4.7 Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von c-Myc auf die CSN-Expression

Um den Einfluss von c-Myc auf die Expression von CSN zu untersuchen, wurde eine spezifische siRNA gegen c-Myc verwendet, welche die Expression dieses Transkriptionsfaktors herunterreguliert.

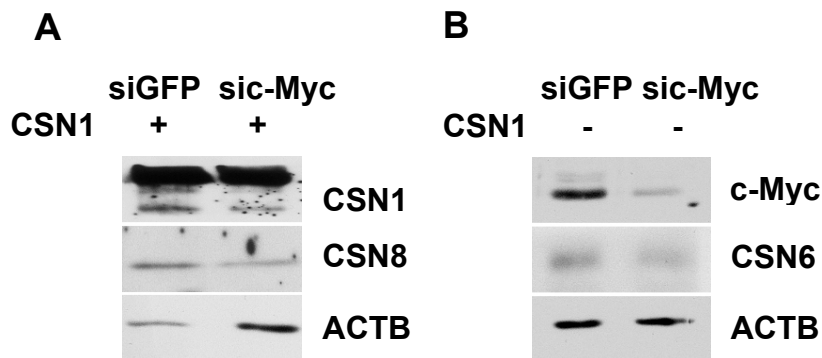


Abbildung 35: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen nach der Transfektion mit His-CSN1-Überexpressionsvektor und sic-Myc bzw. siGFP (Kontrolle). Dabei wurde die Proteinexpression von CSN1 und CSN8 nach Co-Transfektion mit His-CSN1-Vektor und sic-Myc bzw. siGFP untersucht (A) bzw. die Proteinexpression von c-Myc und CSN8 nach Transfektion der siCSN1-Zellen mit sic-Myc bzw. siGFP (B). ACTB diente als Ladekontrolle. Für den Western Blot wurden Antikörper gegen CSN1, CSN6, CSN8, c-Myc und ACTB verwendet.

Durch die Transfektion von spezifischen siRNAs gegen c-Myc (sic-Myc) in siCSN1-Zellen wurde c-Myc deutlich herunterreguliert (Abb. 35 B). Die Proteinexpression von CSN6 war durch die siRNA-vermittelte Repression von c-Myc ebenfalls deutlich vermindert (Abb. 35 B). Die Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1-Überexpressionsvektor führte zu einer Induktion der Neusynthese der CSN-Untereinheiten (Abb. 21). Die Co-Transfektion dieser Zellen mit dem His-CSN1-Vektor und sic-Myc hob diesen induktiven Effekt auf und führte zu einer Reduktion der Expression der untersuchten Untereinheiten CSN1 und CSN8 unter diesen Bedingungen (Abb. 35 A).

4.8 Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von Lin28B auf die CSN-Expression

Chang *et al.* zeigten im Jahre 2009, dass c-Myc durch microRNAs (miRNAs) wie let-7, über die Bindung dieser miRNAs an Lin28B reguliert wird. Das RNA-bindende Protein Lin28B ist ein post-transkriptioneller Repressor von let-7, der dessen Reifung reprimieren kann (Piskounova, 2008; Viswanathan *et al.*, 2008; Hagan *et al.*, 2009). Dabei vermittelt es zusammen mit der terminalen Uridyl-Transferase (TUTase: Zcchc11/TUT4) die Uridylierung von let-7, was die Dicer-Aktivität hemmt und zum Abbau von let-7 führt (Heo, 2008; Hagan, 2009). Um den Einfluss von Lin28B auf die Proteinexpression von CSN zu untersuchen, wurden siCSN1-Zellen mit spezifischen siRNAs gegen Lin28B transfiziert.

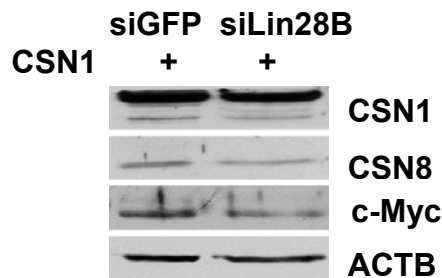


Abbildung 36: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen nach der Co-Transfektion mit dem His-CSN1-Überexpressionsvektor und sic-Lin28B bzw. siGFP (Kontrolle). Dabei wurde die Proteinexpression von CSN1, CSN8 und c-Myc nach Co-Transfektion mit His-CSN1-Vektor und Lin28B si1 und Lin28B si2 (je 0,1 μ M) bzw. siGFP in siCSN1-Zellen untersucht. ACTB diente als Ladekontrolle. Für den Western Blot wurden Antikörper gegen CSN1, CSN8, c-Myc und ACTB verwendet.

Die Co-Transfektion des His-CSN1-Vektors zusammen mit siLin28B si1 und siLin28B si2 bzw. siGFP in siCSN1-Zellen führte nach 48 h zu einer Reduktion der Proteinexpression von c-Myc (Abb. 36) im Vergleich zu Zellen, die mit His-CSN1-Vektor und siGFP transfiziert wurden. Die Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN8 wurde in den mit siLin28B und His-CSN1 co-transfizierten siCSN1-Zellen ebenfalls deutlich verringert (Abb. 36).

4.9 miRNAs der let-7-Familie regulieren die CSN-Proteinexpression

4.9.1 Der Effekt von let-7 Antisense-Inhibitoren auf die CSN-Proteinexpression

Da die siRNA-vermittelte Inhibition von Lin28B zu einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten führte, wurde im nächsten Schritt die Wirkung von let-7 auf die Proteinexpression untersucht. Die hierbei verwendeten let-7-Inhibitoren waren in der Lage, durch Bindung an die entsprechenden miRNAs diese zu hemmen. Zuvor wurden mittels der Datenbank miRBase Sanger (MicroCosm) potentielle miRNAs der let-7-Familie ermittelt, die an CSN-Untereinheiten binden können.

Tabelle 15: Aus der miRBase Sanger Datenbank (MicroCosm Targets Version 5) ermittelte Mitglieder der let-7-Familie, die an Untereinheiten des CSN binden können.

| CSN-Untereinheit | miRNA | Bindestelle (bp) |
|------------------|-----------|------------------|
| CSN2 | let-7e* | 475- 496 |
| CSN3 | let-7g | 234- 254 |
| | let-7i | 234- 254 |
| CSN4 | let-7f | 45-67 |
| | let-7i | 45- 67 |
| | let-7i* | 28- 49 |
| CSN6 | let-7-a1 | 380- 401 |
| | let-7c | 379- 401 |
| | let-7f | 380- 401 |
| | let-7i | 380- 401 |
| CSN7A | let-7f-1* | 727- 749 |
| CSN7B | let-7b | 751- 772 |

Für alle CSN-Untereinheiten außer CSN1, CSN5 und CSN8 wurden mittels der MicroCosm Datenbank mögliche Bindungsstellen für miRNAs der let-7-Familie identifiziert (Tab. 15). Chang *et al.* zeigten im Jahre 2009, dass Zellen mit hohem c-Myc-Gehalt und niedrigem let-7-Gehalt eine erhöhte Expression an CSN1, CSN2, CSN3, CSN6, CSN7B und CSN8 aufwiesen. Mit Hilfe der MicroInspector miRNA target site Software wurden weitere Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie identifiziert.

Tabelle 16: Die mittels der MicroInspector miRNA target site Software (<http://bioinfo.uniplovdiv.bg/microinspector/>) ermittelten Mitglieder der let-7-Familie, die an Untereinheiten des CSN binden können sowie deren Bindestellen.

| CSN-Untereinheit | miRNA | Bindestelle (bp) |
|------------------|----------|------------------|
| CSN1 (Variante1) | let-7-a1 | 1399 |
| | let-7b | 1307 |
| | let-7c | 1399 |
| | let-7d | 1399 |
| | let-7e | 1399 |
| | let-7f | 1399 |
| | let-7g | 1399 |
| | let-7i | 453 |

| | | |
|-------------------|----------|-----------------|
| CSN1 (Variante 2) | let-7-a1 | 916 |
| | let-7b | 824 |
| | let-7c | 916 |
| | let-7d | 916 |
| | let-7e | 916 |
| | let-7f | 916 |
| | let-7g | 916 |
| CSN3 | let-7b | 32 |
| | let-7d | 32 |
| | let-7i | 32; 479 |
| CSN4 | let-7-a1 | 1070 |
| | let-7b | 18; 1070 |
| | let-7c | 970; 1070; 1395 |
| | let-7d | 1395 |
| | let-7e | 1070 |
| | let-7f | 1070 |
| | let-7g | 1395 |
| CSN5 | let-7e | 901 |
| CSN6 | let-7d | 800 |

Die MicroInspector miRNA target site Software ermöglicht unter Angabe der potentiellen Ziel-mRNA und der vermuteten miRNA eine Analyse über mögliche miRNA Bindestellen. Dabei wurden hierfür die Standardeinstellungen der Software verwendet. Die Software ermittelte daraus die möglichen miRNA Bindestellen in den mRNAs der CSN-Untereinheiten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. Für die folgenden Versuche zur Inhibition der let-7-miRNAs wurden die komplementären Antisense-Inhibitoren let-7-a1, let-7c, let-7e*, let-7f und let-7i ausgewählt.

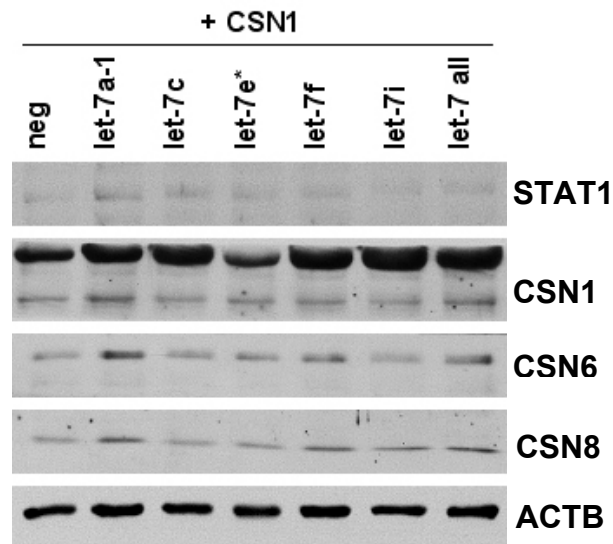


Abbildung 37: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen nach Co-Transfektion von His-CSN1-Überexpressionsvektor mit den komplementären miRNA Antisense-Inhibitoren in siCSN1-Zellen. Co-Transfektion von His-CSN1-Vektor und den entsprechenden miRNA-Inhibitoren (je 0,2 μ M). Neg bezeichnet die Negativkontrolle #1, let-7all ist eine Mischung aller fünf Inhibitoren (insgesamt 0,2 μ M). Es wurde die Expression von CSN1, CSN6, CSN8 und STAT1 untersucht. ACTB diente als Ladekontrolle. Für die Detektion mittels Western Blot-Analyse wurden die Antikörper gegen STAT1, CSN1, CSN6, CSN8 und ACTB verwendet.

Die Co-Transfektion des His-CSN1-Vektor zusammen mit den komplementären miRNA-Inhibitoren führte zu einer Erhöhung der *de novo* Synthese der CSN-Untereinheiten im Vergleich zu den Zellen, die mit His-CSN1-Vektor und der Negativkontrolle co-transfiziert wurden. Dabei war der induktive Effekt bei den Zellen, die mit let-7-a1 und His-CSN1-Vektor co-transfiziert wurden, am deutlichsten (Abb. 37). Ebenso führte die Co-Transfektion des His-CSN1-Vektors mit let-7f bzw. die Kombination aller fünf komplementären Inhibitoren zu einer Erhöhung der CSN-Neusynthese. Dieser Anstieg der Proteinexpression zeigte sich bei allen untersuchten Untereinheiten (CSN1, CSN6 und CSN8) sowie bei STAT1 (Abb. 37).

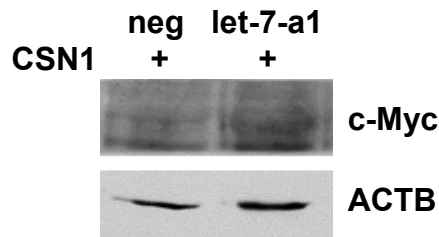


Abbildung 38: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen 48 h nach Co-Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1Vektor und dem komplementären miRNA Antisense-Inhibitor let-7-a1 bzw. der Negativkontrolle (neg). Dargestellt ist der Einfluss der Co-Transfektion des His-CSN1-Vektors zusammen mit dem entsprechenden miRNA-Inhibitoren let-7-a1 (0,2 μ M) bzw. der Negativkontrolle #1 (0,2 μ M) auf die Proteinexpression von c-Myc. Für die Detektion mittels Western Blot-Analyse wurden die Antikörper gegen c-Myc und ACTB verwendet.

Durch die Co-Transfektion von His-CSN1 und dem let-7-a1 miRNA-Hairpin Inhibitor in siCSN1-Zellen kam es nach 48 h zu einer deutlichen Induktion der Proteinexpression von c-Myc, verglichen mit Zellen, die mit Kontroll-miRNA-Inhibitoren transfiziert wurden (Abb. 38).

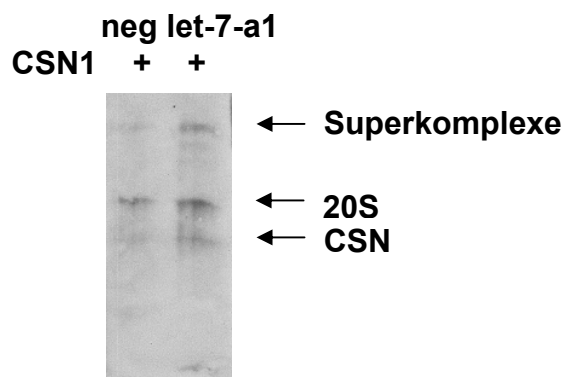


Abbildung 39: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen nach Co-Transfektion mit dem His-CSN1-Vektor und dem let-7-a1 miRNA-Inhibitor bzw. der Negativkontrolle (neg) nach 48 h. Untersucht wurde die Proteinexpression des CSN-Komplexes mittels nativer Gelelektrophorese. Abgebildet ist die Expression des freien CSN-Komplexes (CSN), des CSN komplexiert mit dem 20S Proteasom (20S) sowie dem CSN, integriert in die Superkomplexe (Superkomplexe). Die Detektion der Expression erfolgte mittels Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen CSN8.

Mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese wurde die Proteinexpression der CSN-Untereinheiten bzw. des CSN-Komplexes analysiert. Die Co-Transfektion des His-CSN1-Vektors zusammen mit dem miRNA-Inhibitor let-7-a1 führte nach 48 h, im Vergleich zur Co-Transfektion mit der Negativkontrolle, zu einer Erhöhung der Proteinexpression des CSN-Komplexes sowohl in freier Form (CSN) als auch

komplexiert mit dem 20S Proteasom (20S) sowie integriert in die Superkomplexe (Abb. 39).

4.9.2 Der Effekt von let-7-Mimics auf die CSN-Proteinexpression

miRNA-Mimics werden synthetisch hergestellt und agieren in der Zelle wie miRNAs. Dabei verstärken sie die Wirkung der jeweiligen miRNA auf die entsprechende Ziel-mRNA.

Da der Antisense-Inhibitor für let-7-a1 bei den vorhergehenden Versuchen den deutlichsten Effekt auf die Proteinexpression der CSN-Untereinheiten zeigte, wurde für diese Versuche ein miRNA-Mimic für let-7-a1 verwendet, um dessen Wirkung dieser miRNA auf die Ziel-mRNAs zu verstärken. Dazu erfolgte eine Co-Transfektion der siCSN1-Zellen mit dem His-CSN1-Vektor sowie dem let-7-a1-Mimic (let-7-a1) bzw. der entsprechenden Negativkontrolle (neg).

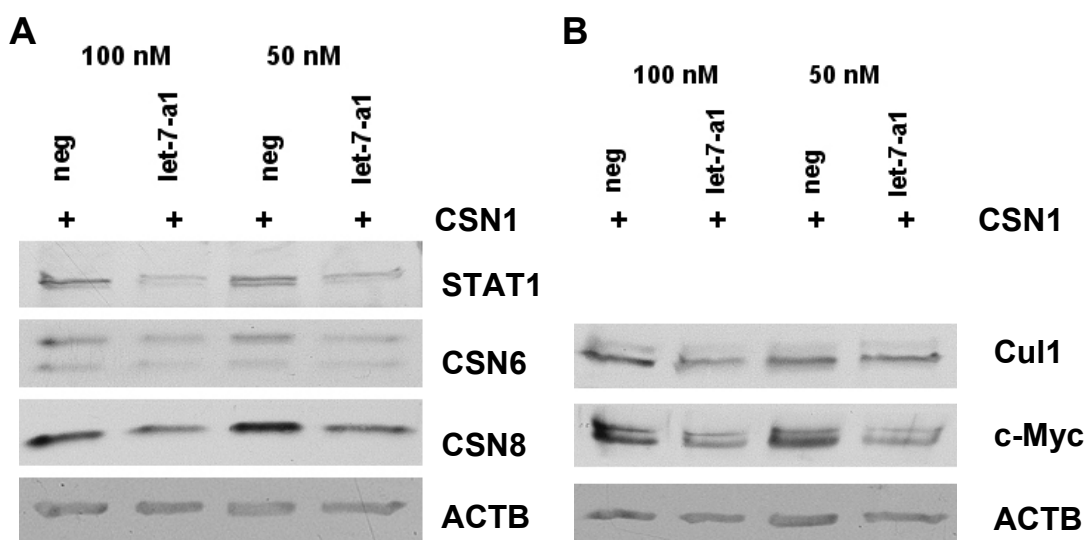


Abbildung 40: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen nach Co-Transfektion der siCSN1-Zellen von His-CSN1-Vektor und verschiedenen Konzentrationen von miRNA-Mimics. Vergleichend dargestellt ist die Co-Transfektion von His-CSN1-Vektor und den entsprechenden miRNA-Mimics (100 nM bzw. 50 nM). Neg bezeichnet die Negativkontrolle #1. Es wurde die Expression von STAT1, CSN6 und CSN8 (A) sowie von Cul1 und c-Myc (B) untersucht. ACTB diente als Ladekontrolle. Für die Detektion mittels Western Blot-Analyse wurden Antikörper gegen STAT, CSN6, CSN8, Cul1, c-Myc sowie ACTB verwendet.

Die Co-Transfektion von His-CSN1 und der let-7-a1 miRNA-Mimics führte im Vergleich zu den mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen, zu einer deutlichen Reduktion der Proteinexpression der untersuchten Signalosomuntereinheiten CSN6

und CSN8 (Abb. 40 A). Ferner wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren STAT1 (Abb. 40 A) und c-Myc (Abb. 40 B) deutlich reduziert. Beide verwendeten Konzentrationen von 100 nM bzw. 50 nM an let-7-Mimics zeigten sich hierbei als effizient, die Proteinexpression der Zielgene zu reprimieren.

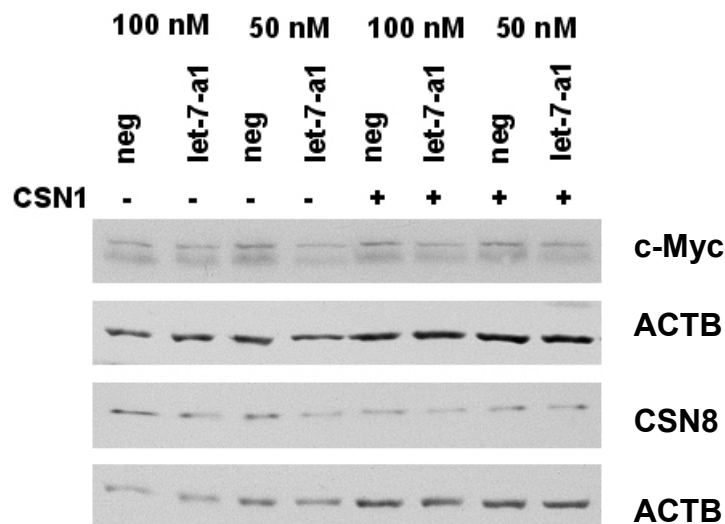


Abbildung 41: Die Proteinexpression von siCSN1-Zellen nach Transfektion von miRNA-Mimics. Es wurden hierfür verschiedene Konzentrationen (50 nM bzw. 100 nM) von miRNA-Mimics ohne (-) oder mit (+) CSN1-Überexpressionsvektor in siCSN1-Zellen transfiziert. Die Expression wurde mittels Western Blot ermittelt. Hierfür wurden Antikörper gegen c-Myc, CSN8 und ACTB verwendet.

Die Transfektion des let-7-a1 miRNA-Mimics in diCSN1-Zellen bewirkte eine Verminderung der Proteinexpression sowohl von CSN8 als auch von c-Myc (Abb. 41). Dabei waren wieder beide verwendeten Konzentration (100 nM bzw. 50 nM) des let-7-Mimics effizient die Proteinexpression von CSN8 und c-Myc zu reprimieren.

4.9.3 miRNAs der let-7-Familie regulieren die Expression des proteasomalen Lids

Durch die vorherigen Experimente konnte eine Regulation der Biogenese des COP9 Signalosoms durch miRNAs der let-7-Familie gezeigt werden. Im Folgenden sollten mittels der Datenbank MicroCosm Mitglieder der let-7-Familie gefunden werden, die Bindestellen in den mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten besitzen.

Tabelle 17: Aus der miRBase Sanger Datenbank (MicroCosm Targets Version 5) ermittelte Mitglieder der let-7-Familie, die an Untereinheiten des proteasomalen Lids binden können. Dabei stellt z. B. let-7a* („*passenger strand*“) die maturierte Variante der Vorläufer Form von let-7a-1 dar. Let-7a wäre dementsprechend der bevorzugt exprimierte „*guide strand*“.

| Lid-Untereinheit | entspricht CSN-Untereinheit | miRNA | Bindestelle (bp) |
|------------------|-----------------------------|-----------|------------------|
| Rpn7 (PSMD6) | CSN1 | let-7e* | 69-90 |
| | | let-7f-2* | 69-90 |
| Rpn3 (PSMD3) | CSN3 | let-7a* | 307-327 |
| | | let-7b* | 306-327 |
| | | let-7d* | 306-327 |
| | | let-7e* | 260-279 |
| | | let-7g* | 170-193 |
| | | let-7f-1* | 306-327 |
| | | let-7f-2* | 260-279 |
| Rpn9 (PSMD13) | CSN7 | let-7g* | 305-325 |
| | | let-7f-2* | 268-289 |
| Rpn12 (PSMD8) | CSN8 | let-7-d* | 125-144 |
| Rpn11 (PSMD14) | CSN5 | let-7d | 146-169 |
| | | let-7g | 146-169 |
| | | let-7i | 132-155 |
| Rpn8 (PSMD7) | CSN6 | let-7a* | 229-249 |
| | | let-7b* | 228-249 |
| | | let-7d* | 228-249 |
| | | let-7f-1* | 228-249 |

Die Ergebnisse aus Tabelle 17 zeigen, dass die mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten Rpn7, Rpn3, Rpn9, Rpn12, Rpn11 und Rpn8 Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie besitzen. Dabei wird deutlich, dass die Lid-Untereinheiten (Tab. 17) im Gegensatz zu den CSN-Untereinheiten (Tab. 15 & 16) hauptsächlich von dem im geringeren Maße exprimierten „*passenger strand*“ der let-7 miRNAs gebunden werden.

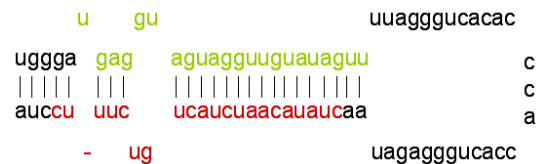


Abbildung 42: Darstellung der humanen let-7a1 Stammschleife. Daraus entsteht durch die Prozessierung durch den Dicer let-7a (5'-ugagguaguagguuguauaguu-3', grüne Sequenz) mit einer Länge von 22 Nukleotiden bzw. let-7a* (5'-cuauacaaucaucugucuuuc-3', rote Sequenz), das 21 Nukleotide lang ist.

Die miRNA-Vorläufer-Formen werden durch den Dicer prozessiert. So kann jede Vorform theoretisch zwei miRNAs produzieren. Jedoch wird nur einer der Stränge in den RISC-Komplex eingebaut, der andere wird meistens degradiert (Hu *et al.*, 2009). Für den Nachweis weiterer Bindestellen von miRNAs der let-7-Familie in den mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten wurde im Folgenden die MicroInspector Software verwendet.

Tabelle 18: Die mittels der MicroInspector miRNA target site Software (<http://bioinfo.uniplovdiv.bg/microinspector/>) ermittelten Mitglieder der let-7-Familie, die an Untereinheiten des proteasomalen Lids binden können, deren Bindestellen und die Bezeichnung der homologen Signalosomuntereinheiten.

| Lid-Untereinheit | entspricht CSN-Untereinheit | miRNA | Bindestelle (bp) |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------|------------------|
| Rpn7 (PSMD6) | CSN1 | let7d | 176; 685 |
| | | let-7e | 177 |
| | | let-7f | 686 |
| Rpn3 (PSMD3) | CSN3 | let-7b | 33; 892 |
| | | let-7c | 33 |
| | | let-7e | 501 |
| | | let-7g | 501 |
| | | let-7a* | 2017 |
| | | let-7b* | 2017 |
| | | let-7e* | 2016; 2063 |
| | | let-7f-1* | 2017 |
| | | let-7f-2* | 2017 |
| Rpn5 (PSMD12) | CSN4 | let-7e* | 175 |
| Rpn9 (PSMD13) (Variante 1) | CSN7 | let-7e | 931 |
| | | let-7b* | 276 |

| | | | |
|---------------|------|---------|----------|
| Rpn9 (PSMD13) | CSN7 | let-7e | 937 |
| (Variante 2) | | let-7b* | 276 |
| Rpn12 (PSMD8) | CSN8 | let-7g* | 307; 683 |
| Rpn8 (PSMD7) | CSN6 | let-7b | 1205 |
| | | let-7c | 1205 |
| | | let-7e | 1205 |
| | | let-7g | 1205 |

Mittels der MicroInspector Software konnten in den Sequenzen der mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten Rpn7, Rpn3, Rpn5, Rpn9 und Rpn12 Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie ermittelt werden. Auch hier wird ersichtlich, dass die proteasomalen Untereinheiten häufig vom „*passenger strand*“ der let-7 miRNAs gebunden werden (Tab. 18).

4.10 Die Analyse der CSN-Assemblierung

Der Mechanismus der Assemblierung des COP9 Signalosoms ist bislang unbekannt. Mittels Dichtegradientenzentrifugation sollte im Folgenden untersucht werden, ob nach der Überexpression von His-CSN1 in siCSN1-Zellen Assemblierungsintermediate auftreten.

4.10.1 Die Analyse der CSN-Assemblierung nach Überexpression von CSN1 in siCSN1-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

In den vorhergegangenen Experimenten wurden die siCSN1-Zellen 48 h nach der Transfektion von His-CSN1 lysiert und mittels Western Blot analysiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Assemblierung des Komplexes jedoch bereits abgeschlossen. Daher wurden im Folgenden die siCSN1-Zellen bereits 15 h nach der Transfektion von His-CSN1 bzw. dem Kontrollvektor untersucht.

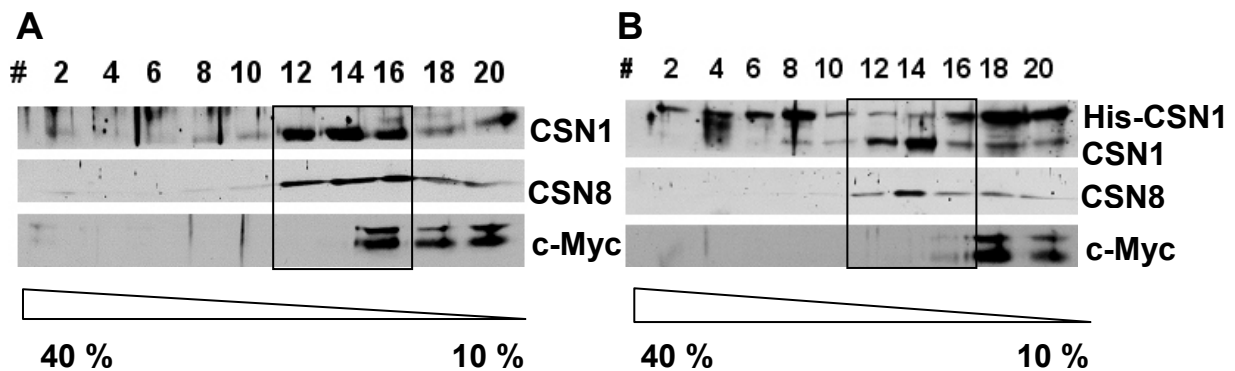


Abbildung 43: Die Analyse der Proteinexpression nach der Transfektion mit dem His-CSN1-Vektor (B) bzw. His-Leervektor (A) in siCSN1-Zellen mittels Glycerolgradienten (40 %-10 % Glycerin). Es wurde die Expression von CSN1, CSN8 und c-Myc untersucht. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen CSN1, CSN8 und c-Myc.

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurde das Lysat von siCSN1-Zellen, die 15 h zuvor mit His-CSN1 (Abb. 43 B) bzw. His-Leervektor (Abb. 43 A) transfiziert wurden, aufgetrennt. Dabei konnten die CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN8 hauptsächlich in den Fraktionen 12- 16 detektiert werden. Ferner konnte eine Co-Sedimentation der CSN-Untereinheiten mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc in den Fraktionen 14 und 16 (Abb. 43 A & B) nachgewiesen werden. Nach der Überexpression von His-CSN1 in den siCSN1-Zellen konnte eine deutliche His-CSN1-Bande detektiert werden, die auf die Transfektion des Überexpressionsvektors zurückzuführen war (Abb. 43 B).

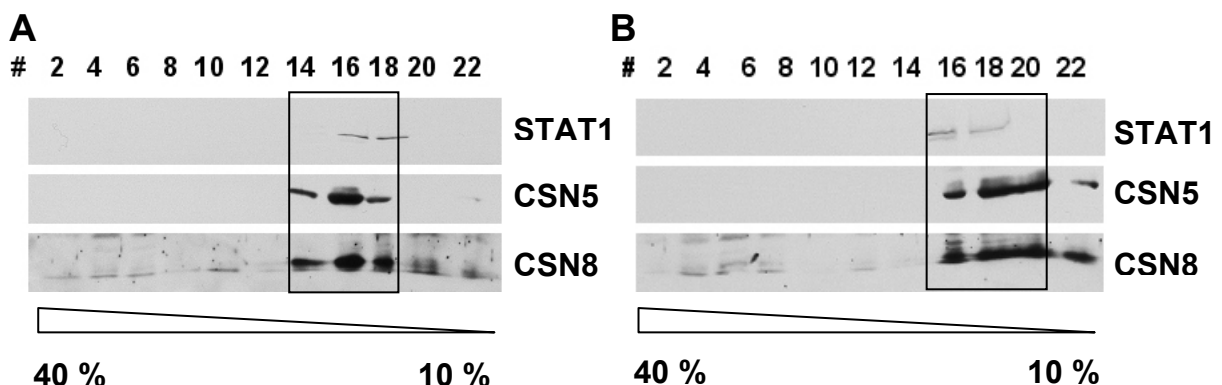


Abbildung 44: Die Analyse der Proteinexpression in siCSN1-Zellen 15 h nach der Transfektion mit dem His-CSN1-Vektor (B) bzw. His-Leervektor (A) mittels Glycerolgradienten (40 %-10 % Glycerin). Dabei wurde die Expression von STAT1, CSN1, CSN5 und CSN8 untersucht. Für die Detektion mittels Western Blot-Analyse wurden Antikörpern gegen STAT1, CSN1, CSN5 und CSN8 verwendet.

Die CSN-Untereinheiten CSN5 und CSN8 waren nach der Dichtegradientenzentrifugation hauptsächlich in den Fraktionen 14-18 detektierbar. Ferner konnte eine Co-Sedimentation des CSN mit dem Transkriptionsfaktor STAT1 in Fraktion 16-18 gezeigt werden (Abb. 44 A & B).

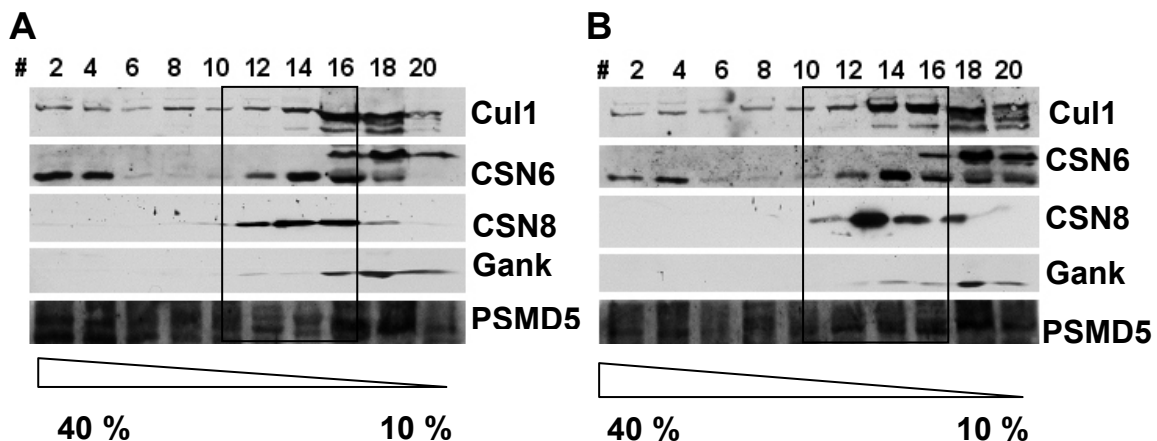


Abbildung 45: Die Analyse der Proteinexpression in siCSN1-Zellen 15 h nach der Transfektion der Zellen mit dem His-CSN1-Vektor (B) bzw. His-Leervektor (A) mittels Glycerolgradienten (40 % -10 % Glycerin). Es wurde die Expression von Cul1, CSN6, CSN8, Gank (Gankyrin) und PSMD5 untersucht. Die Detektion mittels Western Blot-Analyse erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen STAT1, CSN6, CSN8, Gankyrin und PSMD5.

Die Assemblierung des 19S RP des Proteasoms wird durch die Chaperone p28 (Gankyrin/ PSMD10), S5b (PSMD5) und p27 vermittelt (Besche *et al.* 2009; Kaneko *et al.* 2009). Die Dichtegradientenzentrifugation von siCSN1-Zellen, die mit His-CSN1 (Abb. 45 A) bzw. einem His-Leervektor (Abb. 45 B) transfiziert wurden, zeigte, dass die Signalosomuntereinheiten CSN6 und CSN8 in den Fraktionen 12-16 sedimentieren. Das Chaperon Gankyrin sowie Cul1 sedimentierten ebenfalls zum Teil in den Fraktionen 12-16. PSMD5 wurde in allen untersuchten Fraktionen detektiert (Abb. 45 A & B). Ferner konnte in den schweren Fraktionen 2-4 CSN6 nachgewiesen werden, dass nicht zusammen mit den anderen CSN-Untereinheiten sedimentiert (Abb. 45 A & B).

4.10.2 Der Effekt der Zytokinstimulation auf die CSN-Assemblierung

Die Zytokinstimulation führte in den vorhergegangenen Experimenten (Abb. 29-31) zu einer Induktion der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten. Mittels der

Dichtegradientenzentrifugation sollte das Zelllysate nun nach Zytokinstimulation auf Assemblierungsintermediate untersucht werden.

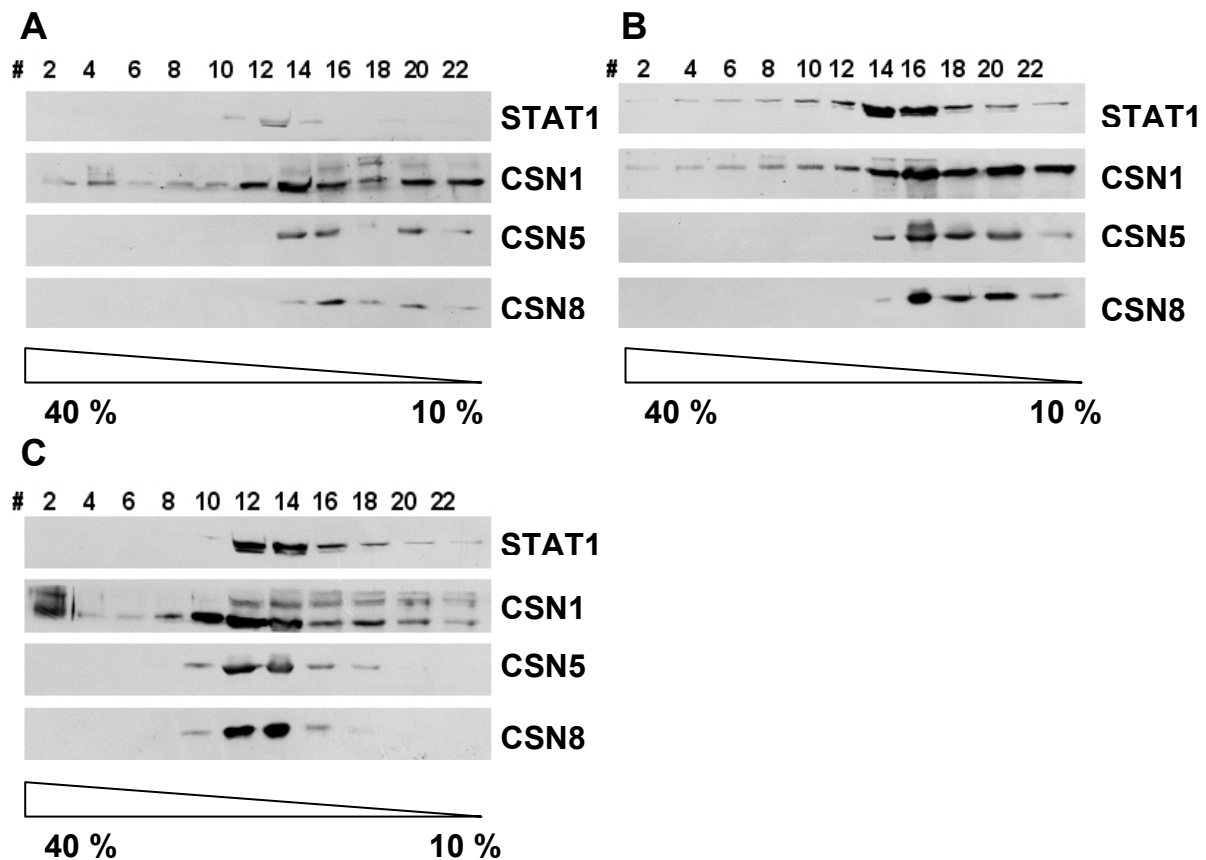


Abbildung 46: Die Proteinexpression in siCSN1-Zellen 0 h (A), 10 h (B) und 15 h (C) nach IFN γ (100 U/ml) Stimulation in siCSN1-Zellen. Die Analyse der Expression von STAT1, CSN1, CSN5 und CSN8 erfolgte mittels eines Glycerolgradienten (40 %-10 % Glycerin). Für die Detektion mittels Western Blot-Analyse wurden spezifische Antikörper gegen STAT1, CSN1, CSN5 und CSN8 verwendet.

Durch die zytokininduzierte Stimulation mit IFN γ kam es nach 10 h (Abb. 46 B) und 15 h (Abb. 46 C) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb. 46 A) zu einer deutlichen Induktion der STAT1 Proteinexpression. 10 h nach der Zytokinstimulation (Abb. 46 B) mit IFN γ konnte STAT1 in allen untersuchten Fraktionen detektiert werden. In unstimulierten Zellen (Abb. 46 A) konnte STAT1 nur in Fraktionen 12-16 detektiert werden. Der Transkriptionsfaktor STAT1 sedimentierte, wie auch nach der Transfektion mit His-CSN1 (Abb. 43 A-B; 44 A-B; 45 A-B), in den selben Fraktionen wie die CSN-Untereinheiten (Fraktion 12-18). Des Weiteren kam es nach der Zytokinstimulation zu einem deutlichen Anstieg der Proteinexpression von CSN1, CSN5 und CSN8 (Abb. 46 A-C).

5. Diskussion

Die Funktionen und der Aufbau des Signalosoms sind in Folge zahlreicher Untersuchungen ausführlich charakterisiert und analysiert worden. Die Mechanismen der Biogenese und der Assemblierung der einzelnen Untereinheiten bzw. des gesamten Komplexes sind bislang unbekannt. Daher befasst sich der Inhalt der hier vorliegenden Arbeit mit der Regulation der Biogenese des COP9 Signalosoms.

Peth *et al.*¹ konnten im Jahre 2007 zeigen, dass die stabile Expression von siRNA-Oligos gegen die CSN1-Untereinheit in HeLa-Zellen zu einer Reduktion des gesamten CSN-Komplexes auf Proteinebene führt. Die transiente Überexpression der herunterregulierten Untereinheit CSN1 in diesen siCSN1-Zellen induzierte die Neusynthese des gesamten Komplexes auf Proteinebene. Eine solche Regulation konnte ferner für transient mit CSN2 transfizierte HeLa-Zellen (Naumann *et al.*, 1999) sowie in stabil mit CSN2 transfizierten murinen B8-Fibroblasten (Huang *et al.*, 2005) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu reduzierte die stabile Transfektion von siRNA-Oligos gegen die Untereinheit CSN5 in HeLa-Zellen die Proteinexpression von CSN5, aber nicht die Expression des gesamten CSN-Komplexes (Peth *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Promotionsarbeit zeigen, dass die Induktion der Expression des gesamten CSN-Komplexes durch die Überexpression der CSN1-Untereinheit in HeLa-Zellen (siCSN1-Zellen) über spezifische miRNAs gesteuert wird. Dies weist auf einen bislang unbekannten Regulationsmechanismus der Biogenese des CSN-Komplexes hin.

5.1 In den siCSN1-Zellen zeigt das CSN nur marginale Veränderungen auf mRNA-Ebene

Die stabil mit siRNA-Oligos gegen die CSN-Untereinheit CSN1 transfizierten HeLa-Zellen (Peth *et al.* 2007) zeigten auf Ebene der mRNA-Expression eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von CSN1, begleitet von einer Reduktion aller untersuchten CSN-Untereinheiten. Dies konnte mittels Microarray-Analyse, semiquantitativer PCR und quantitativer Real-Time PCR verifiziert werden. Mittels Microarray-Analysen wurden Gene identifiziert, die durch die stabile Reduktion von CSN1 in den HeLa-Zellen co-reguliert wurden. Neben den Untereinheiten des CSN waren ebenfalls einige Bestandteile des UPS, wie Rbx1 und Cul1, auf mRNA-Ebene reprimiert. Die Reduktion der mRNA-Expression der Komponenten des UPS könnte

zu einer Verringerung der Aktivität dieses Systems führen und so den proteasomalen Substratabbau verlangsamen. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde bereits in *Neurospora crassa* gezeigt. Hier bewirkte die Inhibition der Untereinheit CSN2 eine erhöhte Autoubiquitinierung und einen schnelleren Abbau von Cul1 und Skp1 im Vergleich zu Wildtypzellen. Dadurch wurde die Proteolyse von spezifischen Substraten verlangsamt (He *et al.*, 2005). In *A. thaliana* führte der Verlust von CSN5 oder CSN6 zur Instabilität bzw. zum Zerfall des gesamten CSN-Komplexes sowie zu einer Destabilisierung der Culline1, 3 und 4 (Gusmaroli *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse der in Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Microarray-Analysen. Die Reduktion der mRNA-Expression von CSN1 in den siCSN1-Zellen könnte so zu einer Destabilisierung von Rbx1 und Cul1 und dadurch zu einem erhöhten Abbau dieser Faktoren durch Autoubiquitinierung führen. Peth *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Expression von Rbx1 in siCSN1-Zellen verringert war. Dies war darauf zurückzuführen, dass aufgrund der verminderten CSN-Expression ebenfalls weniger USP15 vorhanden war. USP15 ist mit der CSN-Untereinheit CSN7 assoziiert und schützt Proteine wie Rbx1 vor Autoubiquitinierung (Peth *et al.*, 2007¹). Ferner wurde bereits gezeigt, dass der „knock-down“ von CSN2 in HeLa-Zellen zu einer Destabilisierung und verminderten Expression der CRLs führt (Schweitzer *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten, welche im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhoben wurden. Durch die verminderte CSN-Expression kam es vermutlich zu einer verringerten USP15 Expression, was zu einer Destabilisierung der CRLs und zu einer reduzierten Expression führte.

Die Überexpression von His-CSN1 induzierte die mRNA-Expression der CSN-Untereinheiten in den siCSN1-Zellen. Diese Ergebnisse konnten durch Microarray-Analysen, semiquantitative RT-PCR und quantitative Real-Time PCR verifiziert werden. Des Weiteren führte die CSN1-Überexpression in diesen Zellen zu einer Induktion der mRNA-Expression von STAT1 und c-Myc. Diese Faktoren sind möglicherweise an der Regulation der Transkription bzw. der Expression der CSN-Untereinheiten beteiligt. Die Analyse der Microarray-Daten zeigte ferner, dass die mRNA-Expression verschiedener Bestandteile des UPS, wie z. B. Cul1, Nedd8, Rbx1 und Cand1, durch die Überexpression von CSN1 in siCSN1-Zellen induziert wurde. Peth *et al.* zeigten, dass das CSN die CRLs stabilisiert und vor Autoubiquitinierung und proteasomalen Abbau schützt (Peth *et al.*, 2007¹). So führten

die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimente nach Transfektion der siCSN1-Zellen mit His-CSN1 zu einer Induktion der *de novo* Synthese des CSN-Komplexes, verbunden mit einem Anstieg von USP15. Daraus resultierte die Stabilisierung der CRLs und eine Erhöhung ihrer mRNA-Expression. Die Änderungen der mRNA-Expression waren sowohl in den siCSN1-Zellen als auch nach Überexpression von His-CSN1 in diesen Zellen nur marginal. Auf Proteinebene konnten deutlich stärkere Effekte beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Biogenese der CSN-Untereinheiten post-transkriptionell reguliert wird. So wird die Expression des Transkriptionsfaktors c-Myc durch miRNAs der let-7-Familie post-transkriptionell gesteuert (Sampson *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009). Durch die verminderte CSN1-Expression in den siCSN1-Zellen und dem damit verbundenen verringerten Gehalt an CSN1-mRNA könnte es zu einem reduzierten Angebot an Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie gekommen sein. Diese miRNAs würden dann an andere potentielle Bindestellen in anderen Ziel-mRNAs, möglicherweise an mRNAs der übrigen CSN-Untereinheiten, c-Myc oder STAT1 binden und deren Translation bzw. Expression hemmen. Dies würde die verminderte mRNA-Expression der Signalosomuntereinheiten sowie von c-Myc und STAT1 erklären. Die Überexpression von His-CSN1 führte in den siCSN1-Zellen zu einem Überangebot an Bindestellen für die Mitglieder der let-7-Familie. Die miRNAs wurden vermutlich „abgefangen“. Dadurch konnten diese nicht an ihre Ziel-mRNAs, wie den CSN-Untereinheiten, c-Myc und STAT1 binden und diese reprimieren, was wiederum zu einer erhöhten Expression dieser Ziel-mRNAs führte (Leppert *et al.*).

5.2 Die Regulation der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten, von STAT1 und c-Myc in siCSN1-Zellen

Die stabil transfizierten siCSN1-Zellen wiesen eine Reduktion der Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten auf. Des Weiteren wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Myc und STAT1 durch die stabile Transfektion von siCSN1 in diesen Zellen deutlich reduziert.

Dass die Überexpression der Untereinheit CSN1 in siCSN1-Zellen zur Induktion der Expression der CSN-Untereinheiten auf Proteinebene führt, konnten Peth *et al.*² bereits 2007 zeigen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten. Dabei führte die transiente Überexpression der Untereinheit CSN1 in den stabil transfizierten siCSN1-Zellen zu einer Induktion der Proteinexpression.

Dies konnte durch native Gelelektrophorese bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass die Transfektion von His-CSN1 in siCSN1-Zellen zu einem Anstieg in der Proteinexpression von STAT1 und c-Myc führte. Die Induktion der Proteinexpression könnte auf eine post-transkriptionelle Regulation durch miRNAs zurückzuführen sein. Dass miRNAs die Expression bestimmter Zielgene modulieren, wurde schon in verschiedenen Systemen gezeigt. So konnten Johnson *et al.* 2005 in HepG2-Zellen eine Regulation von RAS durch miRNAs der let-7-Familie nachweisen (Johnson *et al.* 2005). Des Weiteren ist c-Myc ein Ziel von let-7 (Kim *et al.*, 2009). In den siCSN1-Zellen kam es durch siRNA-vermittelte Repression von CSN1 zu einem verminderten Angebot an Bindestellen für let-7 miRNAs. Diese haben daraufhin vermehrt an Bindestellen anderer Ziel-mRNAs gebunden. Da sowohl die CSN-Untereinheiten als auch c-Myc und STAT1 Bindestellen für let-7 besitzen und somit Ziele von dessen repressorischen Aktivität sind, könnte die Proteinexpression der Zielgene von let-7 auf post-transkriptioneller Regulationsebene reprimiert worden sein. Die Überexpression von His-CSN1 in den siCSN1-Zellen führte zu mehr verfügbaren Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie. Dies resultierte in einer erhöhten Expression der Zielgene wie von c-Myc und den CSN-Untereinheiten, da diese nicht mehr durch miRNAs reprimiert wurden.

5.3 Der Einfluss der Regulation des CSN-Komplexes auf den proteasomalen

Lid

Das Signalosom kann mit Bestandteilen des UPS interagieren und sogenannte Superkomplexe, bestehend aus CRLs, dem 26S Proteasom und dem CSN bilden (Huang *et al.*, 2005). Des Weiteren kann das CSN als alternativer Lid des Proteasoms agieren (Li *et al.*, 2003). Daher wurde die Expression der proteasomalen Lid-Untereinheiten in siCSN1-Zellen auf mRNA-Ebene mittels Microarray-Analyse untersucht. Hierbei konnte eine Korrelation der herunterregulierten Untereinheiten gefunden werden. Die homologen proteasomalen Lid-Untereinheiten zeigten auf mRNA-Ebene ebenfalls eine deutliche Reduktion in siCSN1-Zellen, verglichen mit den Kontroll-Zellen. Nach Transfektion von His-CSN1 in siCSN1-Zellen kam es zu einer Induktion der mRNA-Expression aller untersuchten Lid-Untereinheiten. Li *et al.* zeigten 2003, dass sowohl mehrere α -Untereinheiten (PSMA1 oder PSMA5) als auch β -Untereinheiten (PSMB1, PSMB5, PSMB7) des 20S Proteasoms Zielgene von c-Myc darstellen. Ferner werden Bestandteile des 19S RP (PSMC4, PSMC5) durch

c-Myc reguliert. Einige Lid-Paralogue des CSN sind ebenfalls Ziele der c-Myc-vermittelten Transkriptionsregulation (PSMD3/CSN3, PSMD7/CSN6, PSMD11/CSN2, PSMD8/CSN8) (Li *et al.*, 2003). Daher könnte man vermuten, dass die Co-Regulation der Lid-Untereinheiten in den siCSN1-Zellen möglicherweise durch miRNAs der let-7-Familie vermittelt wird.

5.4 Der Einfluss der CSN2-Überexpression auf die RNA-Expression

In murinen B8-Fibroblasten führte die Überexpression von Flag-CSN2 zu einer Erhöhung der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten (Huang *et al.*, 2005). Dass die Überexpression der CSN-Untereinheiten CSN1 bzw. CSN2 zu einer Induktion der Assemblierung des gesamten CSN-Komplexes auf Proteinebene führt, konnte bereits mehrfach bewiesen werden (Naumann *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005; Peth *et al.*, 2007²). In dieser Promotionsarbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Überexpression von His-CSN1 bzw. Flag-CSN2 in siCSN1- bzw. HeLa-Zellen nur zu einem marginalen Anstieg der mRNA-Expression der untersuchten CSN-Untereinheiten führte. Die Daten der nach der Transfektion von Flag-CSN2 in HeLa-Zellen durchgeführten Microarray-Analysen bestätigen diese Beobachtungen. Ferner korrelieren diese Daten mit den Werten der Microarray-Analyse nach der Überexpression von His-CSN1 in siCSN1-Zellen. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Biogenese der CSN-Untereinheiten post-transkriptionell durch miRNAs reguliert wird. Des Weiteren wurden STAT1, c-Myc, Nedd8 sowie einige Culline deutlich induziert. Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit den ermittelten Werten zur Überexpression von CSN1 in siCSN1-Zellen. Möglicherweise wird durch die Regulation der CSN-Synthese bzw. der Bildung von dessen Untereinheiten die Expression von Komponenten der Superkomplexe co-reguliert. So ist Cul1 ein direktes Zielgen des Transkriptionsfaktors c-Myc (O'Hagan *et al.*, 2000²). Dieser kann die Expression von Cul1 aktivieren und somit die ubiquitin-abhängige Proteolyse bestimmter Substrate induzieren (O'Hagan *et al.*, 2000¹). Ferner wurde bereits gezeigt, dass das CSN die CRLs stabilisiert und somit gegen Autoubiquitinierung und proteasomalen Abbau schützen kann (Peth *et al.*, 2007¹). Durch die Überexpression von Flag-CSN2 in den HeLa-Zellen kam es daher zu einer Stabilisierung der CRLs, gefolgt von einer Induktion der mRNA-Expression seiner Bestandteile.

Ein weiterer Hinweis auf eine post-transkriptionelle Regulation der CSN-Biogenese waren die geringen Änderungen der mRNA-Expression in den stabil transfizierten B8-Fibroblasten. Diese zeigten auf Proteinebene eine deutliche Induktion der Expression des gesamten Komplexes (Huang *et al.*, 2005). Aus den Daten dieser Arbeit erkennt man, dass auf mRNA-Ebene keine Erhöhung der Expression detektierbar war. Daraus kann man schließen, dass die Regulation der Biogenese der CSN-Untereinheiten post-transkriptionell gesteuert wird.

5.5 Die Regulation der CSN-Expression in zytokinstimulierten HeLa-Zellen

Sowohl die siRNA-vermittelte Repression von CSN1 in den siCSN1-Zellen als auch die Überexpression von His-CSN1 in den siCSN-Zellen zeigte einen Effekt auf die STAT1-Expression. Daher sollte die Expression von STAT1 auf einem anderen Weg induziert werden. Ein gut beschriebenes Beispiel hierfür ist die Induktion von STAT1 durch den JAK-STAT-Signalweg, welcher ein essentieller Regulationsweg als Antwort auf die Stimulation mit Zytokinen ist (Darnell *et al.*, 1994). Zytokine übertragen intrazelluläre Signale und regulieren eine Vielzahl wichtiger zellulärer Prozesse wie das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung oder die Immunantwort. (Imada & Leonard, 2000; Leonard & Lin, 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine Interferon α und Interferon γ gehören zur Gruppe der Typ II Zytokine. Beide Interferone aktivieren durch Assoziation an ihre spezifischen Rezeptoren den JAK-STAT-Signalweg. Infolgedessen aktiviert STAT1 die Transkription bestimmter Zielgene (Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006; Schindler & Plumlee, 2008).

In den Versuchen, welche im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurden, führte die IFN α -Stimulation der siCSN1-Zellen zu einer deutlichen Induktion der Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten. Die Induktion der Expression ging mit der Erhöhung der Proteinexpression und der Phosphorylierung von STAT1 in diesen Zellen einher. Dies könnte so erklärt werden, dass die Induktion der Expression und der Phosphorylierung von STAT1 durch IFN α zu einer erhöhten Aktivität dieses Transkriptionsfaktors führte. Die erhöhte Aktivität von STAT1 resultierte dann möglicherweise in einem Anstieg der Expression seiner Zielgene. So konnte bereits in RAMOS-Zellen gezeigt werden, dass bereits 30 min nach Stimulation der Zellen mit IFN α die phosphorylierte Form von STAT1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant anstieg (Su & David, 2000).

Die Stimulation der siCSN1-Zellen mit IFN α führte ferner zu einer erhöhten Proteinexpression von c-Myc. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse einer anderen Arbeit bestätigt, in der gezeigt wurde, dass die IFN α -Stimulation in humanen T-Lymphozyten ebenfalls zu einer Induktion der c-Myc-Expression auf Proteinebene führte (Matikainen *et al.*, 1999). c-Myc ist ein wichtiger Transkriptionsregulator in Zellen (Sears, 2004; Meyer & Penn, 2008). Die Transkription verschiedener Zielgene, wie des Chromatin-bindenden Proteins HMGI/Y, wird durch c-Myc aktiviert (Wood *et al.*, 2000). So könnte eine erhöhte Expression von c-Myc in den siCSN1-Zellen zu einer Induktion der Expression der CSN-Untereinheiten beitragen. In der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde des Weiteren erstmals gezeigt, dass die Behandlung von HeLa-Zellen mit IFN α bzw. mit IFN γ zu einer Induktion der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten und c-Myc führt. Durch die Stimulation der Zellen mit diesen Zytokinen wurde STAT1 aktiviert, was zu einer Induktion der Transkription seiner Zielgene führte (Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006; Schindler & Plumlee, 2008). c-Myc ist ein Zielgen von STAT1 (Dostal *et al.*, 1997). Daher führte die Aktivierung von STAT1 zu einer erhöhten Expression von c-Myc in diesen Zellen, was wiederum zu einer erhöhten Expression der Zielgene von c-Myc führte, zu denen die Untereinheiten des CSN gehören. Li *et al.*, zeigten im Jahre 2003, dass die Untereinheiten CSN3, CSN5 und CSN7A Zielgene von c-Myc sind. Dies würde die erhöhte Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten erklären. So ist es ferner möglich, dass auch die Transkription anderer CSN-Untereinheiten durch c-Myc beeinflusst wird.

5.6 Der Effekt der Inhibition der JAK-Kinasen mittels pharmakologischer Inhibitoren

Die Beteiligung des JAK-STAT-Signalweges am Einfluss der IFN-Stimulation auf die Expression der CSN-Untereinheiten wurde durch weitere Experimente charakterisiert und analysiert. So führte die pharmakologische Inhibition von TYK2 (AG9) bzw. JAK2 (AG490) nach Stimulation der HeLa-Zellen mit IFN γ zu einer Verringerung der Expression der CSN-Untereinheiten. Auch die Expression von c-Myc und STAT1 sowie dessen Phosphorylierung wurde unter diesen Bedingungen reduziert. Am effizientesten war die Kombination beider Inhibitoren zusammen. Gallmeier *et al.* zeigten im Jahre 2005, dass die Behandlung von Pankreas-Läppchen aus Ratten mit AG490 und nachfolgender Stimulation mit IFN γ zu einem deutlichen Rückgang der

STAT1-Phosphorylierung wie auch der STAT1-Proteinexpression führte. Ferner konnte in der Mauszelllinie 32Dp210 und der humanen leukämischen Zelllinie K562 nach Behandlung der Zellen mit dem pharmakologischen Inhibitor AG490 eine Reduktion der c-Myc Expression auf Proteinebene beobachtet werden (Samanta *et al.*, 2006). Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit im Zusammenhang mit der Zytokinstimulation der HeLa-Zellen erhoben wurden. Die Inhibition der Kinasen durch die spezifischen pharmakologischen Inhibitoren führte zu einer Reduktion der STAT1-Phosphorylierung und Expression und damit verbunden zu einer Verringerung der STAT1-Aktivität. Dadurch kam es möglicherweise zu einer Reduktion der Expression von STAT1-Zielgenen, wie c-Myc. Die verminderte c-Myc-Expression führte wahrscheinlich zu einer Reduktion der Expression von c-Myc-Zielgenen, zu denen CSN-Untereinheiten gehören (Li *et al.*, 2003). Ferner kam es durch die Reduktion von c-Myc zu einer Verminderung von Bindestellen für let-7 miRNAs. Diese miRNAs banden im Folgenden an andere Ziel-mRNAs, wie den mRNAs der CSN-Untereinheiten und führten zu einer Reduktion von deren Expression.

5.7 Die Auswirkungen der siRNA-vermittelten Inhibition von STAT1, c-Myc bzw. Lin28B auf die Proteinexpression der CSN-Untereinheiten

Die aus den zuvor durchgeführten Versuchen gewonnenen Ergebnisse führten zu der Frage, ob STAT1 bzw. c-Myc an der Regulation der Biogenese des CSN beteiligt sind. Daher wurden diese Faktoren durch spezifische siRNAs inhibiert. Die siRNA-vermittelte Repression von STAT1 durch Transfektion des siSTAT1-Vektors (Krämer *et al.*, 2006) in HeLa- bzw. siCSN1-Zellen und die nachfolgende Stimulation der Zellen mit Interferonen bewirkte eine Reduktion der Proteinexpression von STAT1 und der untersuchten CSN-Untereinheiten. Hierbei wurde durch die Transfektion des siSTAT1-Vektors in die Zellen die zytokininduzierte *de novo* Synthese des CSN reprimiert. Krämer *et al.* zeigten im Jahre 2006 in der humanen Melanomazelllinie SK37, dass die Transfektion des siSTAT1-Vektors die Expression von STAT1 in diesen Zellen auf Proteinebene reduzierte. Die Behandlung von Sk37-Zellen mit IFN α besaß nach Transfektion von siSTAT1 keinen Einfluss auf die Expression von STAT1 auf Proteinebene (Krämer *et al.*, 2006). Die Aktivierung von STAT1 führt nach Zytokinstimulation zu einer Induktion der Expression bestimmter Zielgene (Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006; Schindler & Plumlee, 2008). Die siRNA-

vermittelte Inhibition von STAT1 resultierte demzufolge in einer verringerten Expression der Zielgene, wie z. B. von c-Myc. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit zeigten, dass die Proteinexpression von c-Myc wie auch die Expression der untersuchten CSN-Untereinheiten verringert wurde. Um zu zeigen, dass die Regulation der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten durch c-Myc vermittelt wird, wurden die Zellen mit spezifischen siRNAs gegen c-Myc transfiziert.

Li *et al.* zeigten im Jahre 2006, dass der „*knock-down*“ von c-Myc mittels spezifischer siRNAs in der pankreatischen Karzinom-Zelllinie Panc1 und der hepatozellulären Karzinom-Zelllinie HepG2 zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression des c-Myc Zielgens PEG10 (*paternally expressed gene-10*) führte (Li *et al.*, 2006). In entsprechender Weise führte die siRNA-vermittelte Inhibition von c-Myc in siCSN1-Zellen zu einer Reduktion der Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten. Dies deutet darauf hin, dass c-Myc an der Regulation der Biosynthese des Signalosoms beteiligt ist. Wie zuvor bereits erwähnt, wird die Expression von c-Myc durch die Bindung von regulatorischen miRNAs gesteuert (Sampson *et al.*, 2007). Daher ist es des Weiteren möglich, dass die Inhibition von c-Myc zu einem Verlust von Bindestellen für miRNAs führt. Dies führt zu einer vermehrten Bindung dieser regulatorischen miRNAs an andere potentielle Bindestellen, wie an den mRNAs der Signalosomuntereinheiten. Dies könnte wiederum zu einer verminderten Translation dieser mRNAs und damit verbunden zu einer reduzierten Proteinexpression dieser Zielgene beitragen.

Ferner steuert c-Myc die Expression des RNA-bindenden Proteins Lin28B. So bindet c-Myc an den Promotor von Lin28B und aktiviert so dessen Transkription (Chang *et al.*, 2009; Kenneth & White, 2009). Lin28B kann die Prozessierung der miRNA let-7 durch Rekrutierung von TUT4 reprimieren. Dieses führt zu einer terminalen Uridylierung der prä-let-7 miRNAs und inhibiert die Dicer Aktivität. Die prä-let-7 miRNAs werden somit nicht weiter prozessiert und im Folgenden degradiert (Heo, 2008; Piskounova, 2008; Viswanathan *et al.*, 2008; Hagan *et al.*, 2009). Viswanathan *et al.* zeigten 2008, dass Lin28B die Prozessierung von pri-let-7g inhibiert. Es konnte ferner demonstriert werden, dass in Zellen, die einen hohen c-Myc Gehalt besitzen let-7 reprimiert ist (Chang *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Co-Transfektion von His-CSN1 und spezifischen siRNAs gegen Lin28B die Expression von c-Myc, wie auch der untersuchten CSN-Untereinheiten, reprimiert ist. Die siRNA-vermittelte

Inhibition von Lin28B führte zu einer Reduktion der Lin28B Expression und damit verbunden zu einer erhöhten Konzentration an let-7 miRNAs. Chang *et al.* demonstrierten 2009, dass die siRNA-vermittelte Inhibition von Lin28B in der B-Lymphozyten Zelllinie P493-6 zu einer Induktion der RNA-Expression von let-7g führt. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inhibition von Lin28B eine Repression der mRNA-Expression von Lin28B (Chang *et al.*, 2009). Infolge der Reduktion von Lin28B und der daraus resultierenden Induktion der let-7 Expression kam es zu einer Verringerung der Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Biogenese der CSN-Untereinheiten durch miRNAs reguliert wird. So könnte die siRNA-vermittelte Inhibition von Lin28B zu einer Reduktion der Expression von Lin28B führen. Dieses bewirkte eine verminderte Uridylierung der let-7 miRNAs durch TUT4. In Folge dessen kam es zu einem erhöhten Level an let-7 miRNAs. Diese konnten verstärkt an spezifische Bindestellen in ihren Ziel-mRNAs binden und deren Translation reprimieren. Sowohl c-Myc als auch die Untereinheiten des CSN beherbergen Bindestellen für Mitglieder der let-7-Familie. Sie sind somit potentielle Ziele für die Bindung von let-7. Dies erklärt die Reduktion der Proteinexpression von c-Myc und der CSN-Untereinheiten unter diesen Bedingungen.

5.8 Der Effekt von komplementären let-7-Inhibitoren auf die CSN-Proteinexpression

miRNAs wie let-7 reprimieren die Translation bestimmter Zielgene (Heo *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009). Um herauszufinden, ob das CSN Ziel einer solchen Regulation ist, wurden im Folgenden spezifische Inhibitoren gegen miRNAs der let-7-Familie verwendet. Dabei handelte es sich um chemisch modifizierte einzelsträngige Oligonukleotide, die partiell sekundäre Haarnadelstrukturen ausbilden. Diese schützen die Inhibitoren vor Abbau und erleichtern die Anlagerung an den RISC-Komplex. Die Sequenz der Inhibitoren ist komplementär zur maturierten miRNA. Sie binden irreversibel endogene miRNAs und kompetitieren gebunden am miRNA-RISC-Nukleoproteinkomplex mit der Ziel-mRNA um die Bindung am miRNA-RISC-Komplex (Vermeulen *et al.*, 2007).

Die Co-Transfektion von His-CSN1 und der komplementären let-7 Inhibitoren induzierte die Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten, von c-Myc und von STAT1. Dieser induktive Effekt der CSN-Expression durch die

komplementären let-7-Inhibitoren war additiv zu der Überexpression von His-CSN1 in den siCSN1-Zellen. Dies wurde mittels nativer Gelelektrophorese bestätigt. Kürzlich gelang es Chang *et al.*, zu zeigen, dass die Transfektion von komplementären miRNA-Inhibitoren in humane B-Lymphozyten (P493-6) zu einer signifikanten Reduktion der Expression von let-7a, let-7d und let-7g führt (Chang *et al.*, 2009). Des Weiteren war die Transfektion von komplementären Inhibitoren gegen let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g und let-7i in murinen embryonalen Stammzellen mit einer signifikanten Reduktion der miRNA-Expression verbunden (Melton *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse bestätigen den reduktiven Effekt der im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten miRNA-Inhibitoren auf die Expression der jeweiligen miRNA. Ferner bewirkte die Transfektion des komplementären Inhibitors der let-7a miRNA in humanen MZ-1 Zellen eine Induktion des Tumorsuppressors NF2 (Neurofibromin 2) auf RNA- und Proteinebene. NF2 besitzt in seiner 3'UTR Bindestellen für let-7a und ist somit ein potentiell Zielgen für miRNAs (Meng *et al.*, 2007). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Transfektion der komplementären Inhibitoren von let-7 die Proteinexpression von Zielgenen der miRNAs der let-7-Familie induziert. Diese Beobachtungen bestätigen daher die Ergebnisse der hier vorgelegten Promotionsarbeit. Die verwendeten spezifischen miRNA Inhibitoren konnten an die entsprechenden let-7 miRNAs komplementär binden. In Folge dessen konnte die miRNAs nicht mehr an ihre Ziel-mRNAs wie c-Myc, STAT1 bzw. die CSN-Untereinheiten anlagern und deren Expression inhibieren. Daraus resultierte die Induktion der Expression der entsprechenden Zielgene. Somit konnte der CSN1-vermittelte Anstieg der Proteinexpression des CSN weiter bestätigt werden.

5.9 Der Effekt von let-7-Mimics auf die CSN-Proteinexpression

miRNA-Mimics sind synthetisch hergestellte doppelsträngige Oligonukleotide, welche die Funktion der entsprechenden miRNA nachahmen und dadurch deren Wirkung verstärken. Die Co-Transfektion von His-CSN1 und dem let-7-a1-Mimic in siCSN1-Zellen führte zu einer Reduktion der Proteinexpression der untersuchten Signalosomuntereinheiten sowie von STAT1 und c-Myc. Ferner reduzierte die Transfektion des let-7-a1-Mimics alleine in siCSN1-Zellen die Proteinexpression von CSN8 und c-Myc.

Kürzlich zeigten Melton *et al.*, dass die Transfektion von let-7c-Mimics in murine embryonale Stammzellen zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression

von Lin28B und c-Myc führte (Melton *et al.*, 2010). In humanen HepG2 Leberkarzinom-Zellen wurde die Expression von c-Myc auf Protein- wie auch auf mRNA-Ebene durch die Transfektion dieser Zellen mit let-7g-Mimics signifikant reduziert (Lan *et al.*, 2010). Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Sowohl die Co-Transfektion von let-7a-Mimics und His-CSN1 als auch die Transfektion des miRNA-Mimics allein, führte zu einer Reduktion der Proteinexpression der entsprechenden Zielgene wie c-Myc und der CSN-Untereinheiten. Die Transfektion der miRNA-Mimics in siCSN1-Zellen führte zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts der miRNAs auf die Translation der entsprechenden Ziel-mRNA. Dies bewirkte eine Reduktion der Proteinexpression der entsprechenden Proteine. Ferner führte die Bindung der miRNAs an die mRNA der verschiedenen Signalosomuntereinheiten zu einer Reduktion der *de novo* Synthese. Diese hob somit den induktiven Effekt der Transfektion von His-CSN1 in den siCSN1-Zellen auf.

5.10 Die Regulation der Biogenese des CSN wird durch miRNAs reguliert

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die Biogenese des COP9 Signalosoms durch miRNAs der let-7-Familie reguliert wird. So konnte bereits mittels eines Luciferase-Assays gezeigt werden, dass let-7-a1 an die mRNA von CSN1 bindet. Es wurde demonstriert, dass let-7-a1 im 3'-terminalen Bereich an der mRNA dieser Untereinheit bindet (Leppert *et al.*).

In der vorgelegten Arbeit wurde ein bislang unbekannter Regulationsmechanismus für die CSN-Biogenese gezeigt (Abb. 46). Hierbei führt die zytokinvermittelte Stimulation von STAT1 zu einer Induktion der Transkription von c-Myc. Des Weiteren bindet c-Myc an den Promotor des RNA-bindenden Proteins Lin28B und aktiviert dessen Transkription (Chang *et al.*, 2009; Kenneth & White, 2009). Lin28B vermittelt zusammen mit der terminalen Uridyl-Transferase TUT4 die Uridylierung von prä-let-7. Dies verhindert die Prozessierung der prä-let-7-miRNA und endet in deren Degradation (Heo, 2008; Hagan, 2009). Daraus resultiert ein verminderter let-7-Gehalt in der Zelle. Diese miRNAs können nicht mehr alle Bindestellen abdecken und es kommt zu einer erhöhten Expression der Zielgene. Ist das Level von c-Myc bzw. Lin28B z. B. durch Transfektion von siRNAs verringert, führt dies zu einem erhöhten Gehalt an let-7 in der Zelle (Chang *et al.*, 2009). Zum einen kann dies auf eine verminderte Uridylierung durch Lin28B/TUT4 zurückzuführen sein, zum anderen

auf ein verringertes Angebot an freien Bindestellen in den Ziel-mRNAs. Die miRNAs lagern sich im Folgenden an die Bindestellen ihrer Ziel-mRNAs und reprimieren deren Translation. Es kommt zu einer verminderten Expression der Zielgene. Da CSN1 ein Ziel für let-7 miRNAs ist, könnte die Überexpression von His-CSN1 in den siCSN1-Zellen möglicherweise zu einem Überangebot an freien Bindestellen für let-7 führen. Die miRNAs könnten im Folgenden von freier CSN1-mRNA abgefangen werden. Dies hätte daraufhin eine Induktion der Expression der Zielgene, wie den CSN-Untereinheiten oder c-Myc, zur Folge (Abb. 46).

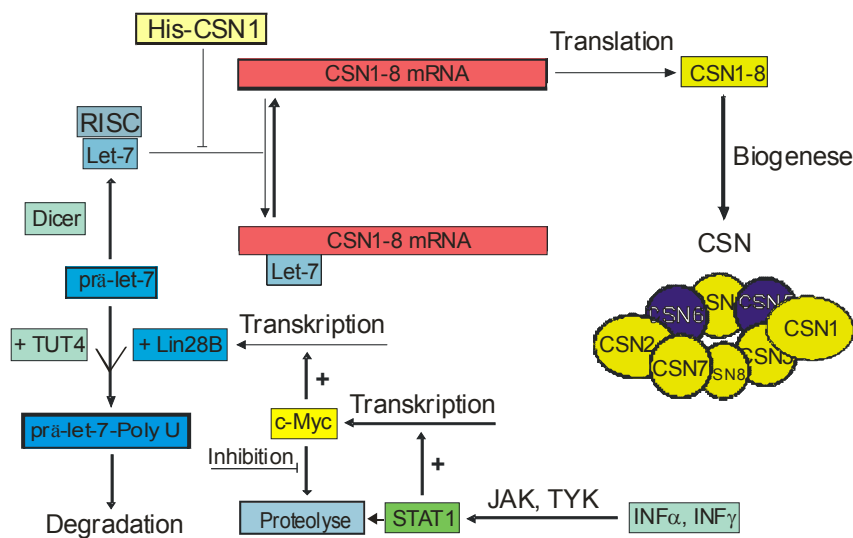


Abbildung 46: Der c-Myc/Lin28B/let-7-Signalweg. Die Biogenese des COP9 Signalosoms wird durch die Expression von c-Myc und dessen Regulation der miRNAs der let-7-Familie gesteuert.

5.11 miRNAs der let-7-Familie binden an die mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten

Aufgrund der Tatsache, dass die Biogenese des COP9 Signalosoms durch miRNAs reguliert wird, interessierte uns im Folgenden, ob die Expression des proteasomalen Lids ebenfalls durch eine solche Regulation moduliert wird. Datenbankrecherchen zeigten, dass die mRNAs der proteasomalen Lid-Untereinheiten hauptsächlich vom weniger stark exprimierten „*passenger strand*“ (miRNA*) der let-7 miRNAs gebunden werden. Nach der Prozessierung der miRNA Vorläuferform durch den Dicer entstehen zwei miRNAs, von denen einer in den RISC-Komplex integriert wird. Hu *et al.* zeigten 2009, dass beide Stränge nicht in gleichem Maße exprimiert werden. Dabei wird der stärker exprimierte „*guide strand*“ bevorzugt in den RISC-Komplex eingebaut. Dieser Strang besitzt einen hohen Gehalt an Purinen (A und G). Der

geringer exprimierte „*passenger strand*“ weist einen hohen Gehalt an Pyrimidinen auf (U und C). Deshalb wird vermutet, dass das Argonaut-Protein (Ago), welches für die Bindung des RISC-Komplexes an die mRNA verantwortlich ist, über spezifische Wechselwirkungen mit dem miRNA-Strang dazu beiträgt, welcher der beiden Stränge in den RISC-Komplex inkorporiert wird (Hu *et al.*, 2009). Okamura *et al.* zeigten 2008, dass miRNA*s Sequenzen aufweisen, welche komplementär zur 3'UTR der entsprechenden Zielgene ist. Des Weiteren wurde demonstriert, dass miRNAs* Ago1 binden können und somit die Expression verschiedener Zielgene reprimieren. Dabei wurde gezeigt, dass sowohl der „*guide strand*“ als auch der „*passenger strand*“ in den RISC-Komplex eingebaut werden können (Okamura *et al.*, 2008). Dies steht im Einklang mit den hier ermittelten Daten für die proteasomalen Lid-Untereinheiten. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass die Expression der proteasomalen Lid-Untereinheiten ebenfalls von miRNAs der let-7-Familie reguliert wird.

5.12 Die Analyse der Assemblierung des CSN mittels

Dichtegradientenzentrifugation

Der Prozess der Assemblierung des Komplexes beschreibt die Zusammenlagerung der einzelnen Untereinheiten. Der Mechanismus der Zusammenlagerung der acht Untereinheiten des Signalosoms ist bisher unbekannt. Kürzlich konnte ein erstes Modell zur Assemblierung des proteasomalen Lids formuliert werden. Bislang wird vermutet, dass die Assemblierung des proteasomalen 19S regulatorischen Partikels durch die Beteiligung von mindestens den drei Chaperonen p28 (Gankyrin), S5b (PSMD5) sowie p27 (PSMD9) vermittelt wird. Diese sind Bestandteile des 19S-Komplexes (non-ATPase10, 5 und 9). Zur Assemblierung bindet jedes der Chaperone ein „Modul“, bestehend aus p28-Rpt3-Rpt6-Rpn6, S5b-Rpt1-Rpt1-Rpn1 und p27-Rpt5-Rpt4 (Besche *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*, 2009; Murata *et al.*, 2009).

Um die Assemblierung des CSN näher zu charakterisieren, wurde Zelllysate mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Dabei sollte das Vorhandensein von Assemblierungsintermediaten bzw. Minikomplexen untersucht werden. Die Überexpression von His-CSN1 führte zu einem Anstieg der Proteinexpression der untersuchten CSN-Untereinheiten. Ferner konnte in den siCSN1-Zellen eine Co-Sedimentation der CSN-Untereinheiten mit STAT1, c-Myc und Gankyrin beobachtet werden. Uhle *et al.* zeigten im Jahre 2003, dass CK2 und PKD nach der

Dichtegradientenzentrifugation in den selben Fraktionen sedimentieren, in denen auch das Signalosom zu finden ist und dass diese Faktoren miteinander interagieren (Uhle *et al.*, 2003). Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnte ferner demonstriert werden, dass der Faktor ICSBP (*Interferon consensus sequence-binding protein*) mit dem CSN interagiert (Cohen *et al.*, 2000). Ausgehend von den Ergebnissen der Dichtegradientenzentrifugation kann man daher sagen, dass die Transkriptionsfaktoren STAT1 und c-Myc mit dem CSN interagieren. Des Weiteren konnte in den schweren Fraktionen sowohl in His-CSN1 als auch in den Kontrollzellen CSN6 detektiert werden. Vermutlich kommt es in freier Form, als Teil eines Assemblierungsintermediates oder als Bestandteil eines Minikomplexes vor. Das proteasomale Assemblierungs-Chaperon Gankyrin sedimentierte ebenfalls teilweise in den selben Fraktionen wie das CSN. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion dieses Chaperons mit dem CSN hin. In diesem Zusammenhang könnte Gankyrin an der Assemblierung des CSN-Komplexes beteiligt sein.

Mittels der Dichtegradientenzentrifugation konnte nach der Stimulation der Zellen mit IFN γ eine deutliche Induktion der Proteinexpression aller untersuchten CSN-Untereinheiten sowie von STAT1 detektiert werden. Die Stimulation der Zellen mit IFN γ führt zu einer Induktion der Expression und der Phosphorylierung von STAT1 und einem Anstieg der Expression seiner Zielgene (Shuai *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999; Clevenger, 2004; Lim & Cao, 2006; Schindler & Plumlee, 2008). Die Zytokinstimulation führte zu einer Induktion der CSN-Proteinexpression. Dies deutet darauf hin, dass STAT1 bedingt durch die Zytokinstimulation eine Expressionserhöhung von c-Myc bewirkte. c-Myc löste vermutlich den oben beschriebenen c-Myc/Lin28B/let-7-Signalweg aus, der für eine erhöhte CSN-Biogenese sorgt. Weitere Versuche sind notwendig, um die Assemblierung des CSN zu verstehen.

6. Zusammenfassung

Das COP9 Signalosom ist ein hochkonservierter Proteinkomplex bestehend, aus acht Untereinheiten. Es ist ein essentieller Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems und kann durch seine enzymatischen Aktivitäten bzw. durch assoziierte Faktoren Bestandteile des UPS modifizieren und somit deren Stabilität und Aktivität regulieren.

In der hier vorgelegten Promotionsarbeit konnte ein bislang unbekannter Regulationsmechanismus der Biogenese des COP9 Signalosoms identifiziert werden. Hierfür wurden zunächst stabil transfizierte HeLa-Zellen (siCSN1-Zellen) analysiert. Die siRNA-vermittelte Reduktion der CSN1-Expression führte zu einer Reduktion der Expression aller CSN-Untereinheiten sowie der Transkriptionsfaktoren c-Myc und STAT1. Die Transfektion von His-CSN1 in siCSN1-Zellen induzierte die CSN-Neusynthese und ferner einen Anstieg der c-Myc- und STAT1 Expression. Die Co-Regulation der CSN-Synthese mit STAT1 und dessen Zielgen c-Myc ließ vermuten, dass die CSN-Biogenese möglicherweise über den JAK-STAT-Signalweg reguliert wird. Tatsächlich konnte durch die Stimulation der Zellen mit IFN α bzw. IFN γ die Induktion der *de novo* Synthese des CSN-Komplexes induziert werden. Die siRNA-vermittelte Inhibition von STAT1, c-Myc bzw. Lin28B führte ebenso wie die Behandlung der Zellen mit AG9 bzw. AG490, pharmakologischen Inhibitoren der JAK-Kinasen, zu einer Reduktion der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten. Es konnte gezeigt werden, dass c-Myc an der Regulation der CSN-Synthese beteiligt ist. Bei allen Experimenten konnte festgestellt werden, dass signifikanten Veränderungen auf der Proteinebene geringfügige Änderungen auf der mRNA-Ebene gegenüberstanden. Daher wurde ein post-transkriptioneller Mechanismus zur Regulation der Expression der CSN-Untereinheiten unter Beteiligung von miRNAs postuliert. Diese Regulation wird vermutlich durch die Aktivität von c-Myc und Lin28B verstärkt. Dies stellt einen neuen, bislang unbekannten Mechanismus für die Regulation der Biogenese des COP9 Signalosoms dar. Da Lin28B und c-Myc an der Regulation der Expression von miRNAs der let-7-Familie beteiligt sind, wurde die Mitwirkung dieser miRNAs an der Assemblierung des CSN weiter untersucht. Die Co-Transfektion der siCSN1-Zellen mit spezifischen komplementären Inhibitoren dieser miRNAs führte zu einer Induktion der Proteinexpression der CSN-Untereinheiten. Die Transfektion von let-7 miRNA-Mimics, welche die Wirkung der

miRNAs nachahmen und diese verstärken, bewirkte eine Reduktion der Expression der CSN-Untereinheiten in den siCSN1-Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten ferner mittels der miRBase Sanger Datenbank und der Software MicroInspector Bindestellen für let-7 miRNAs an den mRNAs der CSN- und der proteasomalen Lid-Untereinheiten identifiziert werden. Da die Expression des proteasomalen Lid-Komplexes nach Überexpression von CSN1 ebenfalls hochreguliert war, könnte dieser Regulationsmechanismus auch für die Biogenese des proteasomalen Lids von Bedeutung sein.

7. Summary

The COP9 signalosome is a highly conserved protein complex composed of eight subunits. It is part of the Ubiquitin-Proteasome-System and is able to modify the stability of these components *via* its enzymatic activities or mediated by associated factors. Thereby, it is involved in the proteolysis of distinct substrates.

In this study a novel, regulatory mechanism of CSN biogenesis was identified. We used stable transfected siCSN1 cells in which the protein and the mRNA expression of CSN subunits as well as of STAT1 and c-Myc were downregulated. Transfection of His-CSN1 in those siCSN1 cells led to the induction of the *de novo* Synthesis of the whole CSN complex. In addition the expression of the transcription factors STAT1 and c-Myc was elevated. The co-regulation of the CSN synthesis and of STAT1 indicate that the CSN biogenesis is possibly regulated *via* the JAK-STAT pathway. To verify this, cells were treated with IFN α or IFN γ , respectively. This resulted in the induction of the CSN *de novo* synthesis. Moreover, the siRNA-mediated inhibition of STAT1, c-Myc, Lin28B as well as treatment with the pharmacological inhibitors AG9 or AG490 led to a reduced protein expression of the analysed CSN subunits. These data suggest that c-Myc is involved in the regulation of the CSN biosynthesis.

We found that in all experiments there was a significant change on protein level in contrast to a marginal change on the RNA level. Based on our study we hypothesized that the CSN biogenesis is regulated post-transcriptionally by miRNAs. The participation of miRNAs in the regulation of CSN biogenesis was further analysed. The siCSN1 cells were transfected with complementary hairpin inhibitors of let-7 miRNAs, leading to an induction of the CSN synthesis. The transfection of let-7 miRNA-mimics, which enhance the impact of miRNA on target mRNAs, resulted in a decrease of the CSN expression. These findings prove the involvement of miRNAs in CSN biogenesis, presumably *via* the c-Myc/Lin28B/let-7 pathway.

Furthermore, using miRBase Sanger database and MicroInspector software, potential binding sites for let-7 miRNAs were detected within the mRNA sequences of CSN subunits as well as of subunits of the proteasomal lid. After overexpression of CSN1 the expression of the proteasomal lid subunits were also elevated. Therefore, there is evidence to suggest that this mechanism is crucial for the regulation of the biogenesis of the proteasomal lid as well.

8. Ausblick

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde gezeigt, dass Mitglieder der let-7-Familie an mRNAs der Untereinheiten des CSN binden können. Bekannt ist, dass sich diese miRNAs bevorzugt in der 3'UTR der Ziel-mRNAs anlagern und diese reprimieren.

Die Bindestellen in den mRNAs wurden jedoch nur für die Untereinheit CSN1 charakterisiert. In weiterführenden Versuchen könnten durch Mutationen die potentiellen Bindestellen verändert und somit die Anlagerung der miRNAs reprimiert werden. Mittels Luciferase-Assays könnte man im Folgenden Veränderungen in der Aktivität der miRNAs detektieren. Aus diesen Ergebnissen würde man auf die genauen Bindestellen der miRNAs schließen können. Ferner könnte beispielsweise, durch RNA-Affinitätsaufreinigung charakterisiert werden, welche let-7-miRNA welche Untereinheit des CSN bindet. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sind bislang nur theoretische Daten über die Bindung von let-7 miRNAs an die mRNAs des proteasomalen Lids erbracht worden. Durch Transfektion der Zellen mit spezifischen komplementären Inhibitoren dieser miRNAs bzw. miRNA-Mimics könnten diese Ergebnisse weiter charakterisiert werden.

Ferner stehen die Untersuchungen zur Assemblierung des COP9 Signalosoms erst am Anfang und müssen in einem zukünftigen Projekt weiter fortgeführt werden.

9. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| μ | mikro |
| μl | Mikroliter |
| Abb. | Abbildung |
| A. bidest | bidestilliertes Wasser |
| A. dest | destilliertes Wasser |
| ACTB | β-Actin |
| AG 490 | Tyrphostin B42, dimethyl sulfoxide alpha-Cyano-(3,4-dihydroxy)-N-benzylcinnamide |
| AG 9 | Tyrphostin A1, (4-Methoxybenzylidene)malononitrile, alpha-Cyano-(4-methoxy)cinnamionitrile |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäuren |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CAND1 | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CK2 | Casein kinase 2 |
| COP | constitutive photomorphogenic |
| CRL | Cullin-RING-Ligase |
| CSN | COP9 Signalosom |
| CTL | Kontrolle (control) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosid-Triphosphate |
| ds | Doppelstrang |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| EDTA | Ethylene-diamine-tetraacetic acid |

| | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------|
| eIF3 | eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 3 |
| FCS | fetales Kälberserum |
| fwd | vorwärts |
| g | Gramm |
| GFP | Green fluorescent protein |
| h | Stunde |
| hIFN α | humanes Interferon alpha |
| hIFN γ | humanes Interferon gamma |
| His | Histidin |
| Jab1 | Jun-activation-domain-binding protein 1 |
| JAK | Januskinase |
| JAMM | Jab1/MPN domain metalloenzyme |
| kb | Kilobase |
| kD | Kilodalton |
| LB | Luria-Bertani |
| M | molar |
| m | milli |
| mA | Milliampere |
| mH | Milliamperestunden |
| mIFN γ | murines Interferon gamma |
| min | Minute |
| miRNA | mikro RNA |
| ml | Milliliter |
| MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| MPN | Mpr1-Pad1-N-terminal |
| mRNA | messenger RNA |
| Nedd8 | neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated 8 |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| NP-40 | Nonidet P40 |
| OD | optische Dichte |
| PAA | Polyacrylamid |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCI | Proteasome, COP9 signalosome, initiation factor 3 |

| | |
|--------|----------------------------------------------------|
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PKD | Protein Kinase D |
| PMSF | Phenylmethansulfonylfluorid |
| Rbx1 | RING box protein 1 |
| rev | rückwärts |
| RING | really interesting new gene |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| Rpn | Regulatory particle non-ATPase |
| Rpt | Regulatory particle, ATPase-like |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse Transkriptase PCR |
| SCF | Skp1-Cul1-F-box protein complex |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sek | Sekunde |
| SH2 | Src-homology 2 |
| siRNA | Short interference RNA |
| ss | Einzelstrang |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| SUMO | small Ub-related modifier |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris Acetate EDTA |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TYK | Tyrosin Kinase |
| U | Einheiten |
| Ub | Ubiquitin |
| UPS | Ubiquitin Proteasom System |
| V | Volt |
| Vh | Voltstunden |
| W | Watt |
| WB | Western Blot |
| Y | Tyrosin |

10. Literaturverzeichnis

Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* Jan;2(1):E2.

Besche HC, Peth A, Goldberg AL (2009). Getting to first base in proteasome assembly. *Cell.* Jul 10;138(1):25-8.

Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 28:295-317.

Bracht J, Hunter S, Eachus R, Weeks P, Pasquinelli AE (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA.* Oct;10(10):1586-94.

Carmell MA, Hannon GJ (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* Mar;11(3):214-8.

Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW (1996). The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell.* 86, 115-21.

Chang TC, Zeitels LR, Hwang HW, Chivukula RR, Wentzel EA, Dews M, Jung J, Gao P, Dang CV, Beer MA, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT (2009). Lin-28B trans-activation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 3;106(9):3384-9.

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell.* May 29;93(5):827-39.

Cheng Y (2009). Toward an atomic model of the 26S proteasome. *Curr Opin Struct Biol.* Apr;19(2):203-8.

Clevenger CV (2004). Roles and Regulation of STAT Family Transcription Factors in Human Breast Cancer. *Am J Pathol.* Nov;165(5):1449-60.

Cohen H, Azriel A, Cohen T, Meraro D, Hashmueli S, Bech-Otschir D, Kraft R, Dubiel W, Levi BZ (2000). Interaction between interferon consensus sequence-binding protein and COP9/signalosome subunit CSN2 (Trip15). A possible link between interferon regulatory factor signaling and the COP9/signalosome. *J Biol Chem.* Dec 15;275(50):39081-9.

Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science.* Oct 18;298(5593):608-11.

Cullen BR (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res.* Jun 1;102(1):3-9.

Dang CV (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* Jan;19(1):1-11.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* Jun 3;264(5164):1415-21.

Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K (2000). Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet.* 16, 289.

Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 78:399-434.

Deshaies RJ, Meyerowitz E (2000). COP1 patrols the night beat. *Nat Cell Biol.* Jun;2(6):E102-4.

Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM (1997). Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol.* Nov;29(11):2893-902.

Eilers M, Eisenman RN (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev.* Oct 15;22(20):2755-66.

Enchev RI, Schreiber A, Beuron F, Morris EP (2010). Structural insights into the COP9 signalosome and its common architecture with the 26S proteasome lid and eIF3. *Structure.* Mar 14;18(4):518-27.

Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *Embo J.* 20, 7096-107.

Füllbeck M, Huang X, Dumdey R, Frommel C, Dubiel W, Preissner R (2005). Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. *BMC Cancer.* Aug 5;5:97.

Gallmeier E, Schäfer C, Moubarak P, Tietz A, Plössl I, Huss R, Göke B, Wagner (2005). ACJAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells. *J Cell Physiol.* Apr;203(1):209-16.

Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* Apr 3;386(6624):463-71.

Groll M, Huber R (2003). Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol.* May;35(5):606-16.

Gusmaroli G, Figueroa P, Serino G, Deng XW (2007). Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with Arabidopsis Cullin3-based E3 ligases. *Plant Cell.* Feb;19(2):564-81.

Hagan JP, Piskounova E, Gregory RI (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* Oct;16(10):1021-5.

Harari-Steinberg O, Chamovitz DA (2004). The COP9 signalosome: mediating between kinase signaling and protein degradation. *Curr Protein Pept Sci.* Jun;5(3):185-9.

He Q, Cheng P, He Q, Liu Y (2005). The COP9 signalosome regulates the *Neurospora* circadian clock by controlling the stability of the SCFFWD-1 complex. *Genes Dev.* Jul 1;19(13):1518-31.

Hendil KB, Kriegenburg F, Tanaka K, Murata S, Lauridsen AM, Johnsen AH, Hartmann-Petersen R (2009). The 20S proteasome as an assembly platform for the 19S regulatory complex. *J Mol Biol.* Nov 27;394(2):320-8.

Henke W, Ferrell K, Bech-Otschir D, Seeger M, Schade R, Jungblut P, Naumann M, Dubiel W (1999). Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid. *Mol Biol Rep.* Apr;26(1-2):29-34.

Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell.* Oct 24;32(2):276-84.

Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, Yeom KH, Han J, Kim VN (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell.* Aug 21;138(4):696-708.

Hetfeld BK, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A, Glickman M, Schade R, Kloetzel PM, Dubiel W (2005). The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol.* Jul 12;15(13):1217-21.

Hetfeld BK, Peth A, Sun XM, Henklein P, Cohen GM, Dubiel W (2008). The COP9 signalosome-mediated deneddylation is stimulated by caspases during apoptosis. *Apoptosis.* Feb;13(2):187-95.

Hotton SK, Callis J (2008). Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol.* 59:467-89.

Hou XS, Melnick MB, Perrimon N (1996). Marelle acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell.* 84:411-19.

Hu HY, Yan Z, Xu Y, Hu H, Menzel C, Zhou YH, Chen W, Khaitovich P (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics.* Sep 4;10:413.

Huang X, Hetfeld BK, Seifert U, Kähne T, Kloetzel PM, Naumann M, Bech-Otschir D, Dubiel W (2005). Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *FEBS J.* Aug;272(15):3909-17.

Huang X, Langelotz C, Hetfeld-Pechoc BK, Schwenk W, Dubiel W (2009). The COP9 signalosome mediates beta-catenin degradation by deneddylation and blocks adenomatous polyposis coli destruction via USP15. *J Mol Biol.* Aug 28;391(4):691-702.

Imada K, Leonard WJ (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol.* Jan-Feb;37(1-2):1-11.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* Mar 11;120(5):635-47.

Kaneko T, Hamazaki J, Iemura S, Sasaki K, Furuyama K, Natsume T, Tanaka K, Murata S (2009). Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell.* May 29;137(5):914-25.

Kapelari B, Bech-Otschir D, Hegerl R, Schade R, Dumdey R, Dubiel W (2000). Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol.* Jul 28; 300(5): 1169-78.

Kato JY, Yoneda-Kato N (2009). Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells.* Oct 22 .

Kawata T, Shevchenko A, Fukuzawa M, Jermyn KA, Totty NF, Zhukovskaya NV, Sterling AE, Mann M, Williams JG (1997). SH2 signaling in a lower eukaryote: a STAT protein that regulates stalk cell differentiation in dictyostelium. *Cell.* Jun 13;89(6):909-16.

Kenneth NS, White RJ (2009). Regulation by c-Myc of ncRNA expression. *Curr Opin Genet Dev.* Feb;19(1):38-43.

Kikuchi A (2000). Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 16;268(2):243-8.

Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* Aug 1;23(15):1743-8.

Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinak S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* Jun 15;129(6):1141-51.

Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M (2009). Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci.* Aug;100(8):1374-81.

Krämer OH, Baus D, Knauer SK, Stein S, Jäger E, Stauber RH, Grez M, Pfitzner E, Heinzel T (2006). Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev.* Feb 15;20(4):473-85.

Kwok SF, Piekos B, Misera S, Deng XW, Muller AJ, Weiland-Heidecker U, Jurgens G (1996). A complement of ten essential and pleiotropic arabidopsis COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* Mar;110(3): 731-42.

Kwok SF, Solano R, Tsuge T, Chamovitz DA, Ecker JR, Matsui M, Deng XW (1998). Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell.* 10,1779-90.

Lan FF, Wang H, Chen YC, Chan CY, Ng SS, Li K, Xie D, He ML, Lin MC, Kung HF (2010). Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by down-regulation of c-Myc and Up-regulation of p16(INK4A). *Int J Cancer.* Mar 22.

Lehrbach NJ, Armisen J, Lightfoot HL, Murfitt KJ, Bugaut A, Balasubramanian S, Miska EA (2009). LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol.* Oct;16(10):1016-20.

Leonard WJ, Lin JX (2000). Cytokine receptor signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol.* May;105(5):877-88.

Leonard WJ, O'Shea J (1998). JAKS AND STATS: Biological Implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16 :293-322.

Li CM, Margolin AA, Salas M, Memeo L, Mansukhani M, Hibshoosh H, Szabolcs M, Klinakis A, Tycko B (2006). PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells. *Cancer Res.* Jan 15;66(2):665-72.

Li H, Chen W, Zhou Y, Abidi P, Sharpe O, Robinson WH, Kraemer FB, Liu J (2009). Identification of mRNA binding proteins that regulate the stability of LDL receptor mRNA through AU-rich elements. *J Lipid Res.* May;50(5):820-31.

Li L, Deng XW (2003). The COP9 signalosome an alternative lid for the 26S proteasome? Trends Cell Biol.13, 507-9.

Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 8;100(14):8164-9.

Lim CP, Cao X (2006). Structure, function and regulation of STAT proteins. Mol. Biosyst. 2;536-50.

Matikainen S, Sareneva T, Ronni T, Lehtonen A, Koskinen PJ, Julkunen I (1999). Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. Blood. Mar 15; 93(6):1980-91.

Mayer RJ, Fujita J (2006). Gankyrin, the 26 S proteasome, the cell cycle and cancer. Biochem Soc Trans. Nov;34(Pt 5):746-8.

Maytal-Kivity V, Piran R, Pick E, Hofmann K, Glickman MH (2002). COP9 signalosome components play a role in the mating pheromone response of *S. Cerevisiae*. EMBO Rep. 3,1215-21.

Maytal-Kivity V, Reis N, Hofmann K, Glickman MH (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. BMC Biochem. 3,28.

Melton C, Judson RL, Blelloch R (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. Nature. Feb 4;463(7281):621-6.

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Smith H, Ueno Y, Patel T (2007). The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. J Biol Chem. Mar 16;282(11):8256-64.

Meyer N, Penn LZ (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. Dec; 8(12):976-90.

Mundt KE, Porte J, Murray JM, Brikos C, Christensen PU, Caspari T, Hagan IM, Millar JB, Simanis V, Hofmann K, Carr AM (1999). The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Curr Biol*. 9, 1427-30.

Murata S, Yashiroda H, Tanaka K (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Feb;10(2):104-15.

Murchison EP, Hannon GJ (2004). miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*. Jun;16(3):223-9.

Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, Ferrell K, Dubiel W (1999). COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem*. Dec 10;274(50):35297-300.

Navon A, Ciechanover A (2009). The 26S proteasome - from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem*. Oct 7.

Nickell S, Beck F, Scheres SH, Korinek A, Förster F, Lasker K, Mihalache O, Sun N, Nagy I, Sali A, Plitzko JM, Carazo JM, Mann M, Baumeister W (2009). Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 21;106(29):11943-7.

O'Hagan RC, Ohh M, David G, de Alboran IM, Alt FW, Kaelin WG Jr, DePinho RA (2000). Myc-enhanced expression of Cul1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev*. Sep 1;14(17):2185-91. (1)

O'Hagan RC, Schreiber-Agus N, Chen K, David G, Engelman JA, Schwab R, Alland L, Thomson C, Ronning DR, Sacchettini JC, Meltzer P, DePinho RA (2000). Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet*. Feb;24(2):113-9. (2)

Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol.* Apr;15(4):354-63.

Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene.* Mar 15;23(11):1985-97.

Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, Dinulescu DM, Lengyel E, Peter ME (2007). Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle.* Nov 1;6(21):2585-90.

Peng Z, Serino G, Deng XW (2001). Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 13, 2393-407.

Peth A, Berndt C, Henke W, Dubiel W (2007). Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability. *BMC Biochem.* Dec 19;8:27. (1)

Peth A, Boettcher JP, Dubiel W (2007). Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability. *J Mol Biol.* Apr 27; 368(2): 550-63. (2)

Petroski MD, Deshaies RJ (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan;6(1):9-20.

Pick E, Hofmann K, Glickman MH (2009). PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Mol Cell.* Aug 14;35(3):260-4.

Pickart CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 70: 503-33.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. Sep 2;309(5740):1573-6.

Piskounova E, Viswanathan SR, Janas M, LaPierre RJ, Daley GQ, Sliz P, Gregory RI (2008). Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol Chem*. Aug 1;283(31):21310-4.

Richardson KS, Zundel W (2005). The emerging role of the COP9 signalosome in cancer. *Mol Cancer Res*. Dec;3(12):645-53.

Rotin D, Kumar S (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jun;10(6):398-409.

Roush S, Slack FJ (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*. Oct;18(10):505-16.

Saha A, Deshaies RJ (2008). Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Mol Cell*. Oct 10;32(1):21-31.

Samanta AK, Lin H, Sun T, Kantarjian H, Arlinghaus RB (2006). Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*. Jul 1;66(13):6468-72.

Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*. Oct 15;67(20):9762-70.

Scheel H, Hofmann K (2005). Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. *BMC Bioinformatics*. Mar 24; 6:71.

Schindler C, Plumlee C (2008). Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19; 311-18.

Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Koning F, Kloetzel PM, Seeger M (2005). The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol.* Dec 16;354(5):1021-7.

Schwechheimer C (2004). The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta.* Nov 29;1695(1-3):45-54.

Schweitzer K, Bozko PM, Dubiel W, Naumann M (2007). CSN controls NF-kappaB by deubiquitinylation of IkappaBalpha. *EMBO J.* Mar 21;26(6):1532-41.

Sears RC (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle.* Sep;3(9):1133-7.

Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W (1998). A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* Apr;12(6):469-78.

Sharon M, Mao H, Boeri EE, Stephens E, Zheng N, Robinson CV (2009). Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure.* Jan 14; 17(1): 31-40.

Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV (2006). Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol.* Aug;4(8):e267.

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. (1994). Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell.* Mar 11;76(5):821-8.

Soond SM, Townsend PA, Barry SP, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A (2008). ERK and the F-box protein betaTRCP target STAT1 for degradation. *J Biol Chem.* Jun 6;283(23):16077-83.

Su L, David M (2000). Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *Biol Chem.* Apr 28;275(17):12661-6.

Sun Y, Wilson MP, Majerus PW (2002). Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J Biol Chem.* Nov 29;277(48):45759-64.

Takaoka A, Yanai H (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* Jun;8(6):907-22.

Torrisani J, Parmentier L, Buscail L, Cordelier P (2007). Enjoy the Silence: The Story of let-7 MicroRNA and Cancer. *Curr Genomics.* Jun;8(4):229-33.

Tsuge T, Matsui M, Wei N (2001). The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol Biol.* Jan 5;305(1):1-9.

Uhle S, Medalia O, Waldron R, Dumdey R, Henklein P, Bech-Otschir D, Huang X, Berse M, Sperling J, Schade R, Dubiel W (2003). Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J.* Mar 17;22(6):1302-12.

Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science.* Oct 18;298(5593):611-5.

Vermeulen A, Robertson B, Dalby AB, Marshall WS, Karpilow J, Leake D, Khvorova A, Baskerville S (2007). Double-stranded regions are essential design components of potent inhibitors of RISC function. *RNA.* May;13(5):723-30.

Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. Apr 4;320(5872):97-100.

Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E (2009). Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol*. Nov;16(11):1148-53.

Wei N, Deng XW (1992). COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *Plant Cell*. 4,1507-18.

Wei N, Deng XW (2003). THE COP9 SIGNALOSOME. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 19:261-86.

Wei N, Serino G, Deng XW (2008).The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci*. Dec;33(12):592-600.

Welcker M, Orian A, Jin J, Grim JE, Harper JW, Eisenman RN, Clurman BE (2004). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 15;101(24):9085-90.

Wolf DA, Zhou C, Wee S (2003).The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol*. Dec;5(12):1029-33.

Wood LJ, Mukherjee M, Dolde CE, Xu Y, Maher JF, Bunton TE, Williams JB, Resar LM (2000). HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene. *Mol Cell Biol*. Aug;20(15):5490-502.

Wu KL, Miao H, Khan S (2007). JAK kinases promote invasiveness in VHL-mediated renal cell carcinoma by a suppressor of cytokine signaling-regulated, HIF-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*. Dec;293(6):F1836-46.

Yang E, Wen Z, Haspel RL, Zhang JJ, Darnell JE Jr. (1999). The linker domain of is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol*. Jul;19(7):5106-12.

Zhou C, Wee S, Rhee E, Naumann M, Dubiel W, Wolf DA (2003). Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell.* Apr;11(4):927-38.

11. Publikationsliste

Leppert U, Henke W, Huang X, Müller JM, Dubiel W (2010). Let-7 miRNAs control the biogenesis of the COP9 signalosome. (eingereicht)

.....
(Ulrike Leppert)

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

.....
(Ulrike Leppert)